



Vlad-Alexandru Toma

Modele biologice în patologia experimentală

Presa Universitară Clujeană

Vlad-Alexandru Toma

•

**MODELE BIOLOGICE
ÎN PATOLOGIA EXPERIMENTALĂ**

Această lucrare a beneficiat de sprijin financiar prin proiectul **Antreprenoriat pentru inovare prin cercetare doctorală și postdoctorală POCU/380/6/13/123886**, proiect cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Capital Uman 2014-2020.

Vlad-Alexandru Toma

**MODELE BIOLOGICE
ÎN PATOLOGIA EXPERIMENTALĂ**

**PRESA UNIVERSITARĂ CLUJEANĂ
2022**

Referenți științifici:

Prof. dr. habil. Bogdan SEVASTRE

Prof. univ. dr. Manuela BANCIU

Prof. univ. dr. Adriana FILIP

ISBN 978-606-37-1484-9

© 2022 Autorul volumului. Toate drepturile rezervate.
Reproducerea integrală sau parțială a textului, prin orice
mijloace, fără acordul autorului, este interzisă și se pedep-
sește conform legii.

Universitatea Babeș-Bolyai
Presa Universitară Clujeană
Director: Codruța Săcelean
Str. Hasdeu nr. 51
400371 Cluj-Napoca, România
Tel./fax: (+40)-264-597.401
E-mail: editura@editura.ubbcluj.ro
<http://www.editura.ubbcluj.ro/>

*„Ceea ce observăm nu este natura în sine,
ci natura expusă metodei noastre de investigare”*

Werner Heisenberg

1925

Cuprins

LISTĂ DE ABREVIERI	13
PREFAȚĂ.....	19
1. MODELUL EXPERIMENTAL.....	21
1.1. Modelul experimental în biologie și medicină	21
1.2. Metodă, model, sistem de modele.....	21
1.3. Modele experimentale multidimensionale	23
2. MODELE EXPERIMENTALE PE ȘOBOLAN DIN RASA WISTAR PENTRU STUDIAREA BIOLOGIEI ȘI PATOLOGIEI STRESULUI NITROOXIDATIV	25
2.1. Proteine cu acțiune prooxidantă: hemoglobina (Hb) și hemeritrina (Hr).....	25
2.1.1. Implicații ale hemoglobinei în generarea stresului nitrooxidativ și a patologiilor asociate	25
2.1.2. Hemeritrina ca agent prooxidant la șobolanul de laborator din rasa Wistar.....	27
2.1.3. Strategii de balansare a stresului nitrooxidativ dezvoltate pe model experimental	28
2.1.4. Stres oxidativ și reacție imună	28
2.2. Compuși vegetali cu acțiune antioxidantă, imunomodulatoare și/sau neuroprotectivă.....	30
2.2.1. Curcumina	30
2.2.2. Alicina și derivați de alicină	31
2.2.3. Mecanisme de reacție general valabile pentru compuși vegetali cu acțiune antioxidantă și imunomodulatoare.....	40

2.3. Extracte vegetale cu proprietăți antioxidante și cu acțiune adjuvantă sau terapeutică în patologii induse experimental.....	44
2.3.1. Bioactivități la extracte vegetale – o paradigmă în fitoterapie.....	44
2.3.1.1. <i>Extracte vegetale de Lamium</i>	46
2.3.1.2. <i>Extracte vegetale de Vaccinium</i>	51
2.3.1.3. <i>Extracte vegetale de Galium</i>	54
2.3.1.4. <i>Extracte vegetale de Malus</i>	56
2.3.1.5. <i>Extracte vegetale de Hypericum</i>	57
2.3.1.6. <i>Extracte vegetale de Cornus</i>	60
 3. MODELE EXPERIMENTALE PENTRU STUDIAREA BIOLOGIEI STRESULUI NITROOXIDATIV INDUS PRIN EXPUNERE LA STRES NEUROPSIHIC A ȘOBOLANULUI DIN RASA WISTAR.....	63
3.1. Relația dintre stresul neuropsihic și stresul nitrooxidativ	63
3.2. Expunerea animalului de laborator la stres neuropsihic.....	65
3.3. Mecanisme de reglare la expunerea repetată la stres neuropsihic	66
 4. REACTIVITATE SISTEMICĂ LA ȘOBOLANUL WISTAR DUPĂ EXPUNERE LA HEMOGLOBINĂ ȘI HEMERITRINĂ ÎN FORMĂ NATIVĂ ȘI DERIVATIZATĂ.....	69
4.1. Design experimental.....	69
4.2. Obținerea de proteine și condiționarea acestora	70
4.3. Protocoale experimentale	71
4.3.1. Analiză hematologică în flux	72
4.3.2. Metode electrochimice în flux.....	73
4.3.3. Metode spectrofotometrice.....	73
4.3.4. Metode turbidimetrice	74
4.3.5. Metode histochimice	74
4.3.6. Analiza statistică	75
4.4. Reacție oxidativă la modelul experimental, după administrarea hemoglobinei și hemeritrinei	75
4.5. Reacție imună sistemică, la modelul experimental, după administrarea hemoglobinei și hemeritrinei.....	78
4.6. Discuții	84

4.7. Concluzii	89
5. STATUSUL OXIDATIV ȘI BIOACTIVITĂȚI ALE CURCUMINEI ASUPRA SISTEMULUI NERVOS ȘI ALE ALICINEI ASUPRA SISTEMULUI IMUNITAR LA ȘOBOLANUL ALB DIN RASA WISTAR	91
5.1. Design experimental	91
5.2. Protocoale experimentale	93
5.2.1. Metode spectrofotometrice.....	93
5.2.2. Analiza hematologică în flux	93
5.2.3. Metode turbidimetrice	93
5.2.4. Western blot.....	94
5.2.5. Metode histologice și imunohistochimice	94
5.2.6. Metode pentru testarea in vitro a alicinei pe limfocite B CD19+	95
5.2.7. Metode de simulare moleculară pe receptori de tip scavenger	96
5.2.8. Analiză statistică	96
5.3. Rolul curcuminei, în modularea reacției antioxidative via ERK $\frac{1}{2}$ – NF-kB în hipocamp și lobul frontal, după terapia cu diazepam	97
5.4. Modularea stresului oxidativ și a reacției imune de către alicină.....	101
5.4.1. Stresul oxidativ și stimularea reacției imune umorale de către alicină.....	101
5.4.2. Acțiunea alicinei asupra limfocitelor B CD19+.....	105
5.5. Discuții	107
5.6. Concluzii	115
6. ACȚIUNEA IN VIVO, A UNOR EXTRACTE VEGETALE, ÎN PATOLOGII ASOCIATE CU DEZECHILIBRE REDOX.....	117
6.1. Design experimental	117
6.2. Protocoale experimentale	119
6.2.1. Metode spectrofotometrice.....	119
6.2.2. Western blot și ELISA	120
6.2.3. Analiza hematologică în flux	120

6.2.4. Examen histopatologic și imunohistochimic	121
5.2.5. Analiză statistică	121
6.3. Compoziție chimică și acțiunea extractelor de <i>Lamium album</i> L. și <i>Lamium purpureum</i> L. asupra unor parametri sangvini și histologici, în condiții de stres de imobilizare	122
6.3.1. Discuții	134
6.3.2. Concluzii	138
6.4. Compoziție chimică și acțiunea protectivă asupra ficatului și rinichiului, a extractului de <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L., după expunerea cronică a șobolanului Wistar la etanol	138
6.4.1. Discuții	143
6.4.2. Concluzii	143
6.5. Acțiunea extractului de <i>Galium verum</i> L., asupra axei hipotalamus – hipofiză – glande suprarenale în condiții de stres de imobilizare.....	144
6.5.1. Discuții	148
6.5.2. Concluzii	150
6.6. Efectul extractului de <i>Malus sylvestris</i> Mill. asupra ficatului steatotic și corelații cu reacția inflamatorie	150
6.6.1. Discuții	154
6.6.2. Concluzii.....	154
6.7. Acțiunea extractului de <i>Hypericum perforatum</i> L. și <i>Hypericum maculatum</i> Crantz la șobolanul alb Wistar cu tulburare anxioasă indusă experimental	155
6.7.1. Discuții	160
6.7.2. Concluzii.....	163
6.8. Efectul extractului de <i>Cornus mas</i> L. asupra arhitecturii și apoptozei testiculare	163
6.8.1. Discuții	167
6.8.2. Concluzii	169
7. STRES OXIDATIV INDUS PRIN STRES NEUROPSIHIC – BIOLOGIA MECANISMELOR CELULARE DIN HIPOCAMP IMPLICATE ÎN ADAPTARE LA FACTORUL STRESOR	171
7.1. Design experimental	171

7.2. Protocoale experimentale	172
7.2.1. Metode spectrofotometrice – evaluarea activității catalazei... 172	172
7.2.2. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)..... 172	172
7.2.3. Metode histochemice și de fluorescență..... 172	172
7.2.4. Metode histologice..... 173	173
7.2.5. Microscopie electronică cu transmisie..... 173	173
7.2.6. Analiză statistică..... 174	174
7.3. Efectul de <i>stress-buffering</i> și structură microscopică la neuroni CA3	174
7.4. Discuții	181
7.5. Concluzii	183
 8. CONVERGENȚA DATELOR EXPERIMENTALE SPRE CĂI FUNDAMENTAL COMUNE.....	 185
 POSTFAȚĂ	 191
REFERINȚE	193

Listă de abrevieri

3-NT	– 3-nitrotirozină
AA	– adrenalină
ABTS	– acid 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic)
AchE	– acetilcolinesterază
AgNP	– nanoparticule de argint
AIF	– factorul inductor al apoptozei
ALB	– albumină
ALT	– alaninaminotransferaza
ANOVA	– Analysis of Variance
APO-1	– anticorp monoclonal anti-Fas
aPTT	– timpul de tromboplastină parțial activată
APZ	– alprazolam
ARE	– Antioxidant Response Elements
ASME	– acetil-shanshizidemtilester
AST	– n aspartataminotransferază
ATPază	– adenzintrifosfatază
BAD	– Bcl-2 associated death promoter
BAX	– Bcl-2 Associated Protein X
Bcl-2	– B-cell lymphoma-2 (proteină)
Bcl-X _L	– B-cell lymphoma-extra large (proteină)
BCR	– B cell receptor / receptorul limfocitului B (responsabil cu sinteza imunoglobulinelor)
BE (b)	– excesul de baze tampon
BE (ecf)	– excesul de baze din fluide extracelulare
BID	– BH3 interacting-domain death agonist
BSA	– albumină serică bovină
BuChE	– butirilcolinesterază
C3C	– complementul C3

CA3(aria)– subzona a hipocampului formată din 3 tratări neuronale dispuse ipsilateral

CaCo2 – colorectal adenocarcinoma cells

CAT – catalază

CD19 – B-lymphocyte antigen CD19 (clusterul de diferențiere 19)

CHOL – colesterol

CMC – carboximetilceluloză

Colec12 – scavenger receptor with C-type lectin domain

COX-2 – ciclooxigenaza 2

CREA – creatinină

CRH – corticotropin releasing hormone

CRP – C reactive protein

CS – corticosteron

CT-26 – carcinomul de colon CT26

Cullin-3 – proteină a complexului Cullin-RING E3 ubiquitin-ligazei, implicat în ubiquitinare

CyOx – citocromoxidază

DADS – dialildisulfid

DAS – dialilsulfid

DATS – dialiltrisulfid

DPPH – 2,2-difenil-1-picrililhidrazil

DTNB – acid ditionitrobenzoic

EDTA_{K2} – etilendiaminoteratracetat dipotasic

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

EndoG – endonucleaza G

eNOS – NO sintaza endotelială

ERK ½ – extracellular signal-regulated kinase 1/2

FADD – Fas-associated protein with death domain

Fas – antigen al apoptozei 1 (APO-1)

FDU – fibroblaste dermice umane

FG-7142 – N-metil-9H-piridol[5,4-b]indol-3-carboxamidă

GABA – acid agama-aminobutiric

GL – glutaraldehidă

GLP-1 – glucagon-like peptide 1

GLP-1R – receptorul pentru glucagon-like peptide 1

GLUC – glucoză

GOT	– glutamat-oxalo transferaza
GPT	– glutamat-piruvat transferaza
GPX	– glutation peroxidaza
GRA	– granulocite
GRA%	– granulocite %
GSH	– glutation redus
Hb	– hemoglobină
HCT	– hematocrit
HDL	– high density lipoproteins / lipoproteine cu densitate crescută
HE	– hematoxină – eozină (colorația)
HepG2	– celule de hepatoblastom tip HepG2
HGB	– hemoglobină (în hemogramă)
HHHS	– axa hipocamp – hipotalamus – hipofiză – glande suprarenale
HPLC	– high performance liquid cromatohraphy / cromatografie lichidă de înaltă performanță
Hr	– hemeritrină
HSA	– human serum albumin / albumină serică umană
HSV	– virusul <i>Herpes simplex</i>
IC ₅₀	– indicele de citotoxicitate stabilit pentru 50% dintre celule
IFN	– interferon (adesea se întâlnește IFN γ , interferonul γ)
IgA	– imunoglobulina A
IgG	– imunoglobulina G
IgM	– imunoglobulina M
IL-1 α	– interleukina 1 α
IL-1 β	– interleukina 1 β
IL-6	– interleukina 6
IL-8	– interleukina 8
iNOS	– NO sintaza inductibilă
JNK	– kinaza Janus
kDa	– kiloDaltoni
Keap1	– Kelch like-ECH – associated protein 1
LDL	– low density lipoproteins / lipoproteine cu densitate scăzută
LYM	– limfocite
LYM%	– limfocite %
LYN	– tirozinkinaza LYN
Maf	– proto-oncogene C – masculoaponeurotic fibrosarcoma

MAO	– monoaminooxidază
MARCO	– macrophage receptor with collagenous structure
MCF-7	– carcinom pulmonar de tip MCF-7
MCH	– mediul corpuscular hemoglobin
MCP-1	– monocyte chemoattractant protein 1
MCV	– medium cellular volume
MDA	– malondialdehidă
MDBK	– celule Madin-Darby Bovine Kidney
metHb	– Hb forma met (oxidată)
MIP	– MIP-macrophage inflammatory protein
MON	– monocite
MON%	– monocite %
Msr1	– macrophage scavenger receptor 1
NAD(P)H	– nicotinamidadenindifosfat redus
NEU	– neutrofile
NEU%	– neutrofile %
NF- $\kappa\beta$	– factorul nuclear $\kappa\beta$
NO	– monoxid de azot
NOS	– specii reactive de azot
NPV	– nucleul paraventricular hipotalamic
Nrf2	– nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NROR	– NADH/rubredoxin oxidoreductaza din <i>Clostridium acetobutylicum</i>
oATP	– ATP oxidat
oxyHb	– hemoglobina în forma oxy (cu Fe^{2+})
p38	– MAPK-p38 mitogen-activated protein kinases
p53	– proteina tumorală p53
pAkt	– proteinkinaza B fosforilată
PBS	– phosphate buffer saline
PC-3	– linie celulară de cancer de prostată
PCA	– Principal Component Analysis
PCT	– trombocrit
PET	– polietilenglicol
PI3K	– fosfatidilinozitol-3-kinaza
PKB	– proteinkinaza B
PLT	– trombocite
pNF- $\kappa\beta$	– factorul nuclear $\kappa\beta$ activat

PT	– timp de protrombină
PUFA	– polyunsaturated fatty acids
RANTES	– regulated on activation normal T cell expressed and secreted
RBC	– eritrocite
Rbr	– rubreritrină
RMN	– rezonanță magnetică și nucleară
ROS	– specii reactive de oxigen
RT-PCR	– real-time PCR (polymerase chain reaction)
SAC	– S-alil-cisteină
SAMG	– S alil-mercaptoglutation
SCAR B1	– receptor scavenger clasa B tipul 1
SCAR B2	– receptor scavenger clasa B tipul 2
SD	– deviație standard
SDS	– dodecilsulfat de sodiu
SEM	– eroarea standard a mediei
SH	– grupare tiolică
SKOV 3	– linie celulară de cancer ovarian derivată din lichid de ascită
SME	– shanshizidmetil ester
SYK	– tirozinaza SYK
TBARS	– specii reactive cu acidul tiobarbituric
TGL	– trigliceride
TGO	– transaminaza glutamat-oxalică
TGP	– transaminaza glutamat-piruvică
THCB	– tetrahidrocarboline
TNF α	– factorul de necroză tumorală α
TP	– proteine totale
Trolox	– acid 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilic, analog hidrosolubil al Vit. E
TUNEL	– terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UDP	– uridin difosfat
UREA	– uree
UV-vis	– ultraviolet-vizibil (domeniu de lungimi de undă în spectrofotometrie)
VADC	– canal anionic voltaj-dependent
VEGF	– vein endothelial growth factor
WBC	– leucocite
β	– HT ₂ – receptorul pentru serotonină, tipul β

Prefață

Considerăm că cei care au curajul de a pune sub semnul întrebării legi sau fenomene considerate înrădăcinate sau de neschimbat, aceia vor aduce o adevărată contribuție la dezvoltarea societății prin cunoaștere. Curiozitatea, pasiunea pentru citit – inclusiv lucrări din alte domenii ale științei – gândirea critică, creativitatea și spiritul analitic se adaugă listei cu abilități esențiale pentru un viitor cercetător. Cât timp mimetismul față de predecesori pune stăpânire pe gândirea ideatică, cât timp adevărul științific se află în afara oricărei îndoieli, cercetătorul nu va face decât să crească numărul celor lipsiți de idei și interesați doar de chestiuni pecuniare. Prezenta lucrare, aduce în prim plan o abordare inedită a cercetării experimentale *in vivo*, prin analiza rezultatelor experimentale atât din perspectivă fiziopatologică cât și prin interpretarea acestora în raport cu modelul experimental folosit.

Viziunea asupra acestei apariții editoriale a fost profund influențată de modul de gândire și experimentare, pe care Santiago Ramon y Cajal, l-a descris în numeroase publicații. Lucrările acestui geniu al experimentării folosind diverse modele biologice, au fost o neîncetată inspirație.

Scopul demersului nostru a fost de a identifica elemente comune existente între diferite aplicații ale unui model experimental *in vivo* și de a investiga totodată reactivitatea biosistemului utilizat în corelație cu activitatea unor biomolecule testate sub aspectul dinamicii stresului oxidativ, a reacției imune respectiv a modificărilor morfologice specifice (cerebrale, glandulare, hepatice, renale, etc.). Modelul experimental folosit a fost aplicat pe șobolanul alb din rasa Wistar, expus la diferiți factori

inductori ai unor dezechilibre metabolice. În aceste situații generate experimental, s-a evaluat totodată bioactivitatea unor proteine prooxidante, a unor compuși vegetali precum și a unor extracte vegetale.

Lucrarea se adresează în primul rând studenților și cercetătorilor din domeniul biologic și medical dar poate constitui un instrument de orientare experimentală și celor care își derulează activitatea în arii conexe celor întâi menționate.

Autorul

1.

Modelul experimental

1.1. Modelul experimental în biologie și medicină

Toate științele analitice recurg la descompunere pentru a experimenta mai bine. Reducerea tuturor manifestărilor vitale ale organismului complex la funcțiile câtorva organe, iar acțiunea acestora la proprietățile țesuturilor, celulelor sau ale elementelor ultrastructurale reprezintă, după cum afirma Claude Bernard, calea obligatorie pentru cercetarea experimentală a unui organism complex. Analiza experimentală descompune fenomenele complexe, în fenomene din ce în ce mai simple până le reduce, dacă este cu putință la numai două condiții elementare necesare pentru apariția fenomenului (Bernard, 1958; Arendt, 2018). Astfel, definim modelul experimental, în biologie și medicină, ca un sistem scos de sub influența cât mai multor factori externi în cadrul căruia fenomenul studiat este redus la un grad ridicat de simplificare și corelat cu natura sa, scopul major fiind cunoașterea legii fenomenului studiat.

1.2. Metodă, model, sistem de modele

Proportional cu complexitatea studiată (modelul folosit), metodele utilizate sunt împrumutate de la unul sau mai multe domenii științifice. Cercetarea viului, care este structurat pe componente organice și anorganice și guvernat de legile naturii impune utilizarea metodelor (i) fizico-chimice (pH, spectrofotometrie, RMN), (ii) a celor biochimice (ELISA, imunohistochimie, imunochimie) și (iii) a celor biologice (care

includ primele două categorii) precum metodele de analiză histopatologică, ultrastructurală sau funcțională. Integrarea metodelor pentru studiul comportamentului, specifice altor arii de specialitate (psihologie, psihiatrie) conduce spre o cercetare interdisciplinară și spre posibilitatea evaluării mai multor modele experimentale în cadrul aceluiași individ, astfel vorbind de sisteme de modele experimentale. Inducerea unei neuropatologii prenatale specifice autismului (modelul biologic cu valproat de sodiu) conduce de pildă spre un sistem de modele experimentale, pe de o parte modelul pentru autism (include evaluarea comportamentală) și pe de altă parte, modelul biologic pentru fibroza hepatică (evaluat morfologic și biochimic). Se conturează astfel necesitatea abordării din mai multe perspective (dimensiuni) a unui model experimental, cu atât mai mult a unui sistem de modele. O trecere în revistă a istoriei folosirii modelelor experimentale animale, cuprinzând momentele astrale ale dezvoltării acestor practici, începe în sec. IV-III, în Grecia Antică, în vremea lui Aristotel și Erasistratus care elaboraseră ideea unei disecții. În sec. II, în Roma, Galen pune bazele vivisecției, folosind animale din gospodărie sau oameni (Mcmillan, 2012). Zece secole mai târziu, în sec. XII, Avenzoar a introdus testarea pe animale a unor tehnici chirurgicale care mai apoi aveau să fie aplicate la oameni. În anul 1242, Ibn al-Nafis, a descris circulația sagvină la animale (Abdel-Halim, 2005). În decursul secolelor care au urmat, nume precum Robert Boyle, Antoine Lavoisier, Pierre Laplace, Louis Pasteur, Otto Loewi și Ivan Pavlov au adus contribuții deosebit de importante cu privire la înțelegerea unor mecanisme ale organismului uman/animal, prin folosirea altor organisme model (West, 2005). O figură cu totul aparte, în privința patologiei experimentale și a folosirii animalelor de laborator în cercetarea biomedicală, a avut-o francezul Claude Bernard, ale cărui contribuții au influențat ireversibil mersul actului de cercetare din sec. al XVII-lea până în prezent. După cum afirma autorul „[...] orice animal poate servi la cercetări fiziologice, fiindcă viața și boala reprezintă totdeauna rezultatul

acelorași proprietăți și, respectiv, al acelorași leziuni, deși mecanismele manifestărilor vitale variază mult” (Bernard, 1957, reed.). Gândirea deterministă pe care Claude Bernard a instituit-o în studiul medicinei experimentale a rămas până în prezent cheia de interpretare a tuturor fenomenelor observate la organismul viu, prin mijloacele de care dispunem.

Parafrazându-l pe S.R. y Cajal, modelul biologic viu, favorizează înlănțuirea cauzală, susține un instinct de a prevedea și de a percepe ideea în fapte și legea în fenomene, astfel încât să se ajungă la o explicație justă, departe de un simplu joc al imaginației științifice (y Cajal, 2004). Pe baza acestor raționamente, în timp, au început să se utilizeze ca modele biologice, în funcție de scopul cercetării, mamifere (șoareci, șobolani, cobai, iepuri, câini, pisici, maimuțe), păsări (găini, prepelițe, cinteze australiene, papagali, corbi, ciori), reptile (șopârlă de câmp, iguană, țestoasă), amfibieni (broaște), pești (pești zebră, caras, țipari) sau nevertebrate (viermi marini, dafnii, artropode, musculița de oțet, etc.). Dintre toate modelele biologice, mamiferele, în special șobolanul alb din rasa Wistar, au beneficiat de un interes în continuă creștere din motive precum: similaritate mare cu metabolismul uman, nevoi de întreținere minime, prolificitate crescută, manipulare facilă, volum sangvin suficient, reactivitate mare la acțiunea factorilor patogeni sau comportament asemănător cu cel uman (explorare, agresivitate, memorare, etc.). Șobolanul alb din rasa Wistar este așadar un model biologic pleiomorf, ale cărui utilizări se vor putea remarca pe parcursul acestei lucrări.

1.3. Modele experimentale multidimensionale

Procese fiziologice, prin complexitatea lor, necesită mai multe unghiuri din care să fie abordate atât în vederea înțelegerii acestora, cât și a bioactivității unor molecule cu potențial terapeutic, adjuvant sau profilactic interpus în șirul de reacții metabolice și comportamentale.

Modelul experimental multidimensional reprezintă așadar modelul biologic pentru un fenomen dat, abordat din perspectivă interdisciplinară, același biosistem fiind evaluat atât din punct de vedere biochimic și morfologic, cât și funcțional sau comportamental. Prin evaluare funcțională înțelegem setul de măsurători care cuprind tensiunea arterială, frecvența cardiacă, funcția electrică miocardică, cerebrală sau musculară, elemente de imagistică RMN sau aspecte ecografice.

2.

Modele experimentale pe șobolan din rasa Wistar pentru studierea biologiei și patologiei stresului nitrooxidativ

2.1. Proteine cu acțiune prooxidantă: hemoglobina (Hb) și hemeritina (Hr)

2.1.1. Implicații ale hemoglobinei în generarea stresului nitrooxidativ și a patologiilor asociate

Hemoglobina (Hb) (**Fig. 1a**) este o proteină tetramerică, cu rol în transportul O_2 , CO_2 , NO, formată dintr-o grupare proteică, globina, și o grupare prostetică, hemul, care conține un atom de fier cuplat cu inelul porfirinic al hemului (Reeder și Wilson, 2005). Fierul este un metal activ din punct de vedere redox, cu valență variabilă, astfel susținând o serie de reacții atât de autooxidare, cât și de generare de radicali liberi (Scurtu și colab., 2013). Când fierul heminic este stare redusă (feros, Fe^{2+}), are loc legarea și transportul oxigenului. Cu toate acestea, după cum demonstrează Reeder și Wilson (2005), Scurtu și colab. (2013), Rifkind și colab. (2015) sau Kock și colab. (2016), oxigenul molecular fiind un agent prooxidant, determină oxidarea Fe^{2+} (oxyHb) la Fe^{3+} (metHb) și transformarea hemoglobinei în methemoglobină, reacția generând totodată radicali superoxid (O_2^-), hidroxil, dar și peroxid (din degradarea superoxidului). Aceste reacții sunt pH dependente (pe măsură ce pH scade sub 9, crește rata de formare a methemoglobinei) și au loc în decursul câtorva ore când hemoglobina este localizată în eritrocite sau pot fi

accelerate la câteva secunde atunci când hemoglobina este extracelulară (hemoglobină liberă), după cum au demonstrat atât Alayash și colab. (2001) și Svistunenکو (2005), cât și Simoni și colab. (2009). În prezența peroxidului, atomul de fier heminic Fe^{3+} (metHb) se oxidează la Fe^{4+} (radicalul feril). Feril-hemoglobina este așadar rezultatul proceselor constante de oxidare și autooxidare ale hemoglobinei- Fe^{2+} întâlnite cu prevalență în condiții de stres neuropsihic, inflamație sau exerciții fizice intense (Alayash, 2004). Feril-Hb joacă un rol de agent generator de radicali liberi (superoxid, peroxid) conducând astfel la peroxidarea lipidică membranară (în special acidul arahidonic), formarea isoprostanului/neuroprostanului (din oxidarea acidului docosahexanoic) și inducerea unor dezechilibre redox (Reeder și Wilson, 2005; Scurtu și colab., 2013). Prezența simultană a peroxidului și a NO conduce la formarea peroxinitritului și apariția stresului nitrozativ. Peroxinitritul reacționează cu resturile de tirozină ale proteinelor formând 3-nitrotirozina, un parametru experimental specific stresului nitrozativ (Pietraforte și colab., 2003). Hemoglobina este așadar un inductor al speciilor reactive de oxigen și de azot, conducând la formarea condițiilor specifice stresului nitro-oxidativ. Administrarea intravenoasă, la șobolanul de laborator, de hemoglobină liberă polimerizată cu scopul evitării extravazării, determină în decurs de 12 ore, peroxidare lipidică membranară, activare imună (celulară și umorală) și leziuni hepatice și renale, după cum am observat în cercetări anterioare (Toma și colab., 2016). Hemoglobina liberă polimerizată/derivatizată administrată intravenos la șobolanul alb din rasa Wistar este așadar un model de inducere a stresului nitrooxidativ extrem de apropiat de cazuri fiziopatologice concrete (hemoliză intravasculară, rezistență globală scăzută sau terapie cu nitrați vasodilatatori).

2.1.2. Hemeritrina ca agent prooxidant la șobolanul de laborator din rasa Wistar

Hemeritrina (**Fig. 1b**) este o proteină citoplasmatică nonheminică cu doi atomi de fier ($\text{Fe}^{2+} - \text{Fe}^{2+}$) care transportă gaze respiratorii, filogenia acesteia fiind încă subiect de cercetare (Scurtu și colab., 2013). Datele actuale demonstrează prezența secvențelor genomice corespunzătoare hemeritrinei la arhea (3), bacterii (118) și eucariote (fungi, cnidari, anelide) și absența în ancesorii deuterostomienilor (Bailly și colab., 2008). Hemeritrina nu reacționează cu peroxidul de hidrogen, NO și nitritul. Masa moleculară a Hr este de 108 kDa (Hb are masa moleculară de 64 kDa) fapt care îi conferă un grad ridicat de menținere în sisteme vasculare evitând extravazarea sau eliminarea renală, fenomene întâlnite în cazul hemoglobinei libere (Moț și colab., 2010; Scurtu și colab., 2013; Hathazi și colab., 2014). Datele experimentale sugerează faptul că hemeritrina nu generează stres oxidativ sau în cazul în care este implicată în generarea acestuia, rolul acestei proteine este secundar, întrucât stresul oxidativ generat este urmarea reacției imune pe care hemeritrina o activează (Toma și colab., 2018).

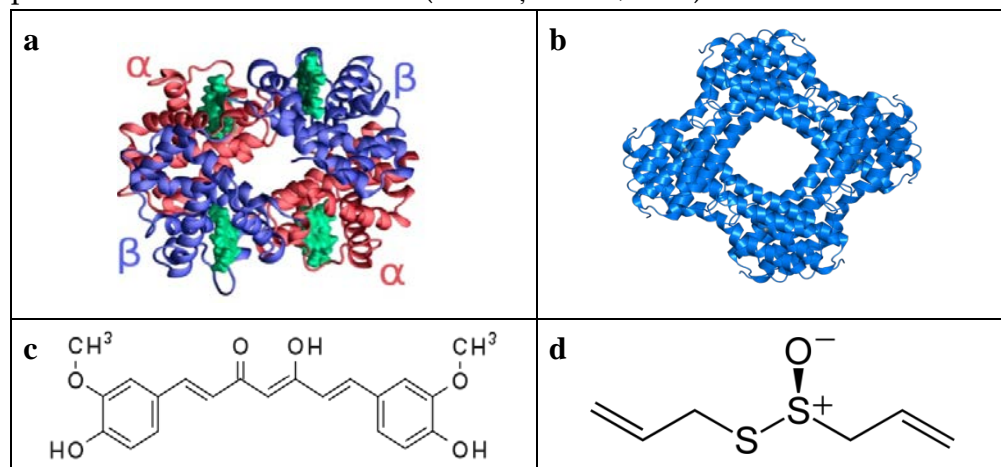


Fig. 1. Structura tetramerică a Hb (după Bringas și colab., 2017) (**a**), structura homooctamerică a Hr (PDB) (**b**), structura curcuminei (PubChem) (**c**) și alicinei (PubChem) (**d**). Acțiunea prooxidantă sau antioxidantă a Hb, Hr, curcuminei sau alicinei se datorează mecanismelor prin care aceste molecule pot genera radicali liberi (Hb, Hr), pot genera și capta radicali liberi (curcumina) sau pot doar capta radicali liberi cum este cazul alicinei.

2.1.3. Strategii de balansare a stresului nitrooxidativ dezvoltate pe model experimental

Noțiunea de balansare a stresului oxidativ și a stresului ca termen general se regăsește în cercetări anterioare (Toma și colab., 2017) sau se regăsește sub denumirea de *stress buffering effect* în cercetări din domeniul psihologiei sau al neuroștiințelor (Wheaton, 1985; Zschucke și colab., 2015). Balansarea stresului oxidativ cuprinde suma de procese celulare și biochimice pe care biosistemul folosit le dezvoltă, cu scopul direcționării adaptative a proceselor endogene și diminuarea efectului nociv al agentului stresor (radicali liberi în cazul nostru). După cum s-a arătat în cercetări anterioare (Pitman și colab., 1988; Roman și colab., 2015; Sugama și colab., 2016; Toma și colab., 2017), expunerea la stres oxidativ nu este de la început un eveniment nociv modelului experimental, primele etape de reacție ale biosistemului fiind reprezentate de stimularea activității mitocondriale (citocromoxidazei, succinatdehidrogenazei), stimularea sistemului imunitar sau stimularea ratei metabolice. Expunerea prelungită și/sau repetată la stres oxidativ, de altfel fenomen inerent în organismele aerobe, conduce la depășirea capacității celulare de balansare a acțiunii radicalilor liberi, moment în care statusul redox celular este înclinat spre stare preponderent oxidată, iar bazele celulare ale patologiilor specifice stresului oxidativ încep astfel să apară.

2.1.4. Stres oxidativ și reacție imună

Între stresul nitrooxidativ și reacția imună există o corelație invers proporțională specifică statusului redox celular al momentului în care este prelevată proba biologică (Lee și colab., 2015; Toma și colab., 2019) în vederea determinărilor biochimice. Determinările biochimice cuprind enzime ale stresului nitrooxidativ (catalaza, superoxid dismutaza, glutation peroxidaza, NO sintaza/iNOS, eNOS), markeri generali

nonenzimatici ai stresului nitrooxidativ (grupări tiolice, glutation redus, 3-nitrotirozina, malondialdehida/TBARS), markeri specifici moleculari ai stresului nitrooxidativ (Nrf2, Bcl-2, NF- κ B, ERK $\frac{1}{2}$) sau evaluarea gradului de exprimare a genelor (RT-PCR) corespunzătoare citokinelor sau enzimelor asociate dezechilibrelor redox celulare. Tamponarea radicalilor liberi de către sistemele enzimatic și nonenzimatic celulare favorizează la nivelul limfocitelor B sinteza și secreția imunoglobulinelor (Toma și colab., 2019), fapt care sugerează corelația stresului nitrooxidativ cu reacția imună mediată umoral. Adesea, stresul oxidativ este însoțit de procese inflamatorii (Farcaș și colab., 2019), ca în cazul administrării intravenoase de Hb sau Hr. În aceste condiții, proteinele dezvoltă o serie de reacții redox menționate în subcapitolele 2.1.1 și 2.1.2, dar au totodată un caracter imunogen și proinflamator. Derivatizarea Hb/Hr cu molecule menite să reducă stresul nitrooxidativ autogenerat, să crească masa moleculară pentru a reduce extravazarea endotelială sau să ofere rezistență complementară la atacul radicalilor liberi, nu conduce în toate cazurile la diminuarea caracterului imunogen. Uneori, aceste derivatizări determină exacerbaria acestuia, după cum demonstrează o serie de cercetări asupra substitutelor sangvine (Toma și colab., 2016; Toma și colab., 2018; Wu și colab., 2018), unde variate forme de Hb și Hr au fost testate pe șobolani de laborator în vederea selecției, optimizării și validării celor mai performante dintre acestea. Expunerea șobolanului de laborator la Hb sau Hr nativă sau derivatizată este asociată cu procese inflamatorii care amplifică reacția imună mediată celular, alături de reacția imună mediată umoral.

Modelele experimentale pentru imunostimulare specifică ambivalentă (umorală și celulară) și stres nitrooxidativ sunt așadar completate de modelul privind expunerea biosistemului la Hb sau Hr administrate intravenos (între acestea fiind diferențe nete sub aspectului generării de radicali liberi).

2.2. Compuși vegetali cu acțiune antioxidantă, imunomodulatoare și/sau neuroprotectivă

2.2.1. Curcumina

Curcumina este un poliofenol vegetal (Fig. 1c) cu multiple bioactivități printre care se numără efecte hipoglicemice, hipolipemice, anxiolitice, neurotrofice, antineoplazice, adjuvante în sindromul metabolic, antifungice, antibacteriene, antiinflamatoare și antioxidante după cum arată numeroase date din literatură (Maheshwari și colab., 2006; Jurenka, 2009; Noorafshan și Ashkani-Esfahani, 2013; Hewlings și Kalman, 2017). Acțiunea antioxidantă a curcuminei este corelată cu doze/concentrații mari ($> 5 \mu\text{M}$), în timp ce dozele mici de curcumină conduc la generarea radicalilor hidroxil și superoxid în urma reacției Fenton-Haber-Weiss (Fig. 2) prin care Fe^{3+} este redus la Fe^{2+} după cum arată Kunchandy și Rao (1990). Ak și Gülçin (2008) demonstrează proprietățile curcuminei de *free radical scavenging* în raport cu antioxidanți de sinteză cu activitate standard (Trolox, DPPH, ABTS), iar rezultatele obținute arată că activitatea de captare a peroxizilor este de $28.4 \pm 3.9\%$ în timp ce Trolox are activitatea de captare a peroxizilor de $25.6 \pm 3.3\%$, iar un antioxidant natural precum α -tocoferolul prezintă o activitate de $13.6 \pm 2.9\%$. În raport cu α -tocoferolul care prezintă o activitate de captare a superoxizilor de $22.2 \pm 3.3\%$, pentru curcumină, aceiași autori au înregistrat o activitate de $42.7 \pm 8.1\%$. Această valoare este însă mai mică decât cea a unui *free radical scavenger* sintetic (butilhidroxianisol sau butilhidroxitoluen) pentru care activitatea de captare a superoxizilor se încadrează în intervalul 70-75%.

Curcumina reduce gradul de peroxidare lipidică încetinind astfel fenomenele de necroptoză și susține mecanismele interne celulare de revenire la un status redox optim, după cum menționează Menon și Sudheer (2007) sau Parada și colab. (2015). Pe lângă proprietățile antioxidante, curcumina este cunoscută în egală măsură pentru acțiunea antiinflamatoare (preparate din turmeric aplicate local sau administrate enteral) demonstrată. Curcumina scade concentrația interleukinelor

proinflamatoare și în mod deosebit a IL-1 β și diminuează experimarea TNF α și NF-k β , mecanismele acestea punând curcumina în grupa aflată în continuă dezvoltare a fitocompușilor cu proprietăți antioxidante și antiinflamatoare. Ceea ce este specific însă curcuminei este dozodependența efectelor (rar întâlnită la polifenoli), acțiunea sa modulatorie asupra angiogenezei și efectele antiinflamatorii remarcabile în urma administrării *per se* după cum demonstrează studiile efectuate atât pe modele experimentale pe șobolan sau șoareci (Wang și colab., 2015), cât și studiile cu subiecți umani (Kunnumakkara și colab., 2017).

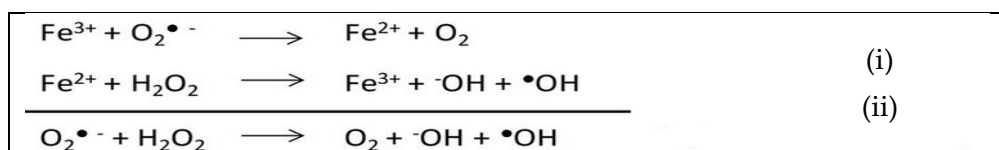


Fig. 2. Reacția Fenton (i) – Haber-Weiss (ii). Reacția FHW se regăsește la toate organismele aerobe și fundamentează generarea radicalilor liberi(superoxid, peroxid) prin mecanisme endogene, la nivelul cărora diferiți antioxidanți se pot interpune sau pot tampona mediul de reacție, conducând la scăderea abundenței speciilor reactive de oxigen și – indirect – a speciilor reactive de azot.

2.2.2. Alicina și derivați de alicină

Paradigma stresului oxidativ descrie o serie de efecte nocive pe care acesta le produce în cadrul variatelor procese celulare (funcția acizilor nucleici, editarea proteinelor, răspunsul neuroendocrin, răspunsul imunologic etc.). Cu toate acestea, fenomenele oxidative dezvoltate până la un anumit prag (limita dintre biologic și patologic) au efecte stimulatorie și pregătitoare pentru celulă în vederea unor posibile atacuri oxidative mai puternice după cum arată Zhang (2006). Mecanismele endogene de răspuns în fața atacului speciilor reactive de oxigen și azot (acestea fiind preponderant implicate în stresul oxidativ sau nitro-oxidativ) cuprind mecanisme de activare imediată a unor gene responsabile de defensiva antioxidantă, mecanisme enzimatice (enzime deja existente în celulă) și nonenzimatice. Activarea genică se realizează

prin molecule semnal sau prin mediație umorală indirectă. Moleculele semnal cuprind compuși care au proprietatea de a se lega de anumiți factori de transcriere sau care acționează direct asupra unui operon sau a unei gene prin mecanisme de inducție sau represie genică (enzimatică). Mediația umorală indirectă a activării defensosomului¹ antioxidant face referire la procesele celulare dereglate de către ROS și NOS care induc un status celular nefavorabil, celula reacționând printr-o serie de mecanisme adaptative (activarea unor kinaze, stimularea sintezei de echivalenți reducători prin calea glicolică, cea a pentozofosfaților, sinteza fosfolipidelor membranare etc.).

Alicina activează calea de semnalizare *Nrf2-Keap1-ARE* (Li și colab., 2012; Xu și colab., 2014; Borlinghaus și colab., 2014). Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) este un factor de transcriere codificat de o genă omoloagă, fiind sub aspect structural o proteină pe motivul fermoarului leucinic (**Fig. 3**), ca majoritatea factorilor de transcriere însă de tipul Bzip (basic leucine zipper), motiv bine conservat de-a lungul evoluției (Entrez Gene Nuclear factor erythroid-derived 2 – like 2).

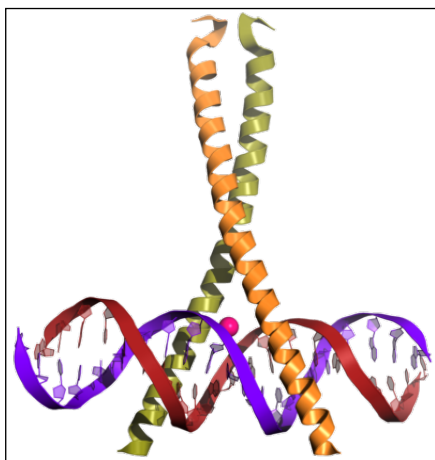


Fig. 3. Structura 3D a modului în care motivul fermoar leucinic interacționează cu ADN (Ellenberger, 1994).

¹ Defensosom: totalitatea factorilor celulari care răspund în mod defensiv în fața unui atac, cu scopul protejării celulei prin anularea factorului perturbator (după Edrada-Ebel și colab., 2018; Toma și colab. 2017).

Proteina prezintă două regiuni: una mediază legarea Nrf2 la regiunile ADN specific, iar a doua (cu motivul fermoarului leucinic) intermediază dimerizarea a două regiuni de ADN prin intermediul argininei și lisinei (Chan și colab., 1995; Zhang, 2006). În absența stresului oxidativ, Nrf2 este reținut în citoplasmă cu ajutorul unui cluster proteic format din Keap1 (Kelch like-ECH – associated protein 1) și Cullin-3 care degradează proteine prin ubiquitinarea realizată de Cullin-3 (Kobayashi și colab., 2004). Stresul oxidativ sau prezența agenților electrofili destabilizează clusterul Keap1-Cullin3, iar Nrf2 este eliberat, translocat în nucleu unde formează heterodimeri cu proteina Maf (proto-oncogene C – **mas**culoaponeurotic fibrosarcoma), se leagă în amonte de regiunea promotor pentru mai multe gene antioxidative (numite generic ARE: Antioxidant Response Elements) și le declanșează transcrierea (Ioth și colab., 1997) (**Fig. 4**).

Alicina și alți compuși organosulfurici similari activează Nrf-2 pentru că dețin un centru electrofil care poate servi ca punct de atac pentru nucleofili ca grupările SH prezente în Keap1 (Li și colab., 2012). Genele target sunt cele care codifică NAD(P)H quinon-oxidoreductaza, glutamat cistein ligaza (enzimă limitantă în sinteza glutationului), preoxiredoxinele, hemoxigenaza-1, glutation-S-transferaza, UDP-glucuronosiltransferaza și proteine asociate cu rezistența la mai multe medicamente (multidrug resistance proteins) (Kwak și colab., 2001; Chanas și colab., 2002; Zhang, 2006, Li-Hui și colab., 2012). Stabilirea acestor funcții ale proteinei Nrf2 s-a realizat în urma unor cercetări legate de stresul oxidativ folosind șoareci Nrf2-knockout, observându-se astfel că blocarea Nrf2 determină reducerea drastică a exprimării genelor pentru proteinele enzimatice antioxidative. Mai mult decât atât, blocarea Nrf2 conduce la creșterea sensibilității la xenobiotice și totodată apare rezistența la acțiunea protectivă a antioxidantilor (Aoki și colab., 2001; Chan și colab., 2001; Enomoto și colab., 2001; Ramos-Gomez și colab., 2001; Rangasami și colab., 2004, Zhang, 2006).

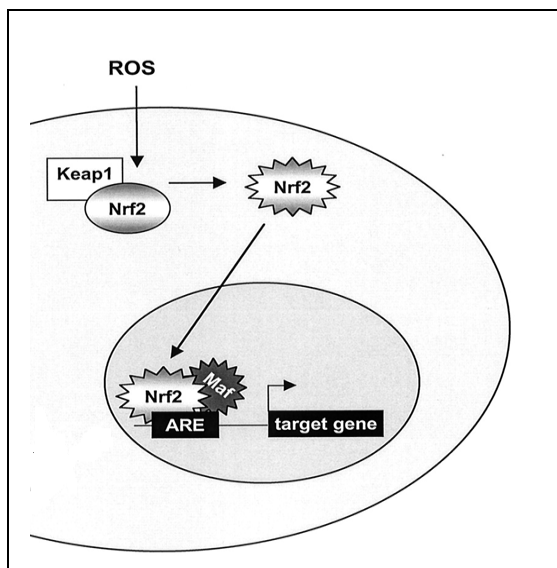


Fig. 4. Reprezentare generală a căii de semnalizare Nrf2-Keap1-ARE (după Braun și colab., 2002).

Prin activarea acestor mecanisme antioxidative, alicina se numără printre cei mai activi compuși vegetali cu acțiune antioxidantă, care pot fi folosiți în fitoterapia umană, alături de luteolin, kemferol, ascorbat sau quercitrin. *In chimico*, alicina și extractele de *Allium* își păstrează proprietățile antioxidante, determinate prin metode tradiționale (DPPH, Trolox). În perspectivă, se dorește evaluarea activității antioxidante a alicinei și a unor extracte de *Allium* folosind metode mai apropiate de modele biologice, cum este metoda cu hemoglobin-ascorbat peroxidază sau cea cu citocrom C (Moț și colab., 2015).

Acțiunea antioxidantă a alicinei este comparabilă cu cea a S-alil-cisteinei, cunoscută drept "burete" pentru superoxid (Kim și colab., 2001; Maldonado și colab., 2003; Medina-Campos și colab., 2007), peroxid (Ide și colab., 1996; Ho și colab., 2001), hidroxil (Numagami și Ohnishi, 2001; Chung, 2006) și peroxinitrit (Kim și colab., 2006; Medina-Campos și colab., 2007). Pe lângă S-alil-cisteină, literatura mai menționează derivați alilsulfenici cu funcții redox: S-alil-mercaptocisteina (pentru hidroxil și superoxid), N- α -(1-deoxy-D-fructozo-1-yl)-L-arginina care neutralizează peroxidul și inhibă sinteza LDL-Cu²⁺ dependentă (acțiune antiaterosclerotică) (Colín-González și colab., 2012). Aceiași autori demonstrează că acțiunea

antioxidantă a S-alil-cisteinei și a alicinei împreună cu produșii de degradare ai acestora se datorează și proprietăților fier-chelatoare ale acestor molecule. Prin reacția Fenton (a) și Haber-Weiss (b), fierul sau cuprul ionic liber produc ROS și radicali hidroxil. S-alil-cisteina (30 $\mu\text{g/mL}$) și alicina au proprietatea de a chelata Fe^{2+} și Fe^{3+} într-un mod dependent de concentrația alilsulfenderivatului (Dairam și colab., 2008). Prin acțiunea sa antioxidantă manifestată inclusiv la nivel genetic, alicina joacă un rol proeminent în ciclul celular normal sau patologic întrucât influențează într-un mod hotărâtor statusul redox al celulei. Starea de oxidare celulară influențează decisiv o serie de căi de semnalizare menite să întrețină celula și totodată poate avea efecte hotărâtoare asupra schimburilor de informație dintre celule (comunicarea biochimică intercelulară).

Odată cu apariția metabolismului oxidativ, celula devine expusă unor stresori care pot induce o serie de mecanisme apoptotice, autofagice, oncotice sau piroptotice (Fink și Cookson, 2005). Liu și colab. (2015), Xu și colab. (2014) alături de Li și colab. (2012), prin cercetările lor de citometrie în flux, au demonstrat efectul proapoptotic al alicinei manifestat în culturi de celule canceroase și acțiunea stimulatorie asupra sintezei și funcției proteinei p53. Alicina induce fosforilarea JNK (Jannus Kinase) care la rândul ei induce activarea grupului proteic mitocondrial reglator al apoptozei Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) prin intermedierea mitocondriei. Aceste evenimente conduc la translocarea unor cantități crescute de BAX (**Bcl-2 Associated Protein X**) în mitocondrie. BAX formează heterodimeri cu alte proteine din familia Bcl-2 cu rol activator al apoptozei și totodată această proteină interacționează cu canale ionice mitocondriale de tipul VADC (voltage-dependent anion channel). Interacțiunea BAX cu VDAC mitocondriale determină pierderea potențialului membranar extern mitocondrial și pierderea citocromului C de la acest nivel. Expresia genei BAX este controlată de supresorul tumoral p53 care are roluri cruciale în ciclul celular. p53 controlează, la finalul fazei G1 și înainte de startul

metafazei, dacă ADN care urmează să fie transmis unei celule fiice este sau nu corespunzător cerințelor structural-funcționale ale viitoarei celule. Alicina are în acest caz, două căi majore de acțiune: activarea JNK și activarea p53. Pe de altă parte, acțiunea sa se poate reduce fie la activarea p53, fie la activarea JNK, întrucât între aceste proteine există strânse relații funcționale. Mecanismul exact prin care alicina are efecte proapoptotice nu este pe deplin cunoscut după cum au afirmat și Xu și colab. (2014).

Alicina este implicată în calea caspazei 9, de altfel cale prevalentă de inducție a apoptozei în celula animală. Menționăm totodată, legătura dintre calea caspazei 9 cu cea a caspazei 8, activată sub acțiunea unor citokine (TNF, interleukine) sau a Fas (antigen de apoptoză, sinonim cu APO-1) asupra FADD (Fas associated death domain). Alternativ, mitocondria eliberează în citosol, sub acțiunea ROS, NOS, a citokinelor, și în situații de dezintegrare membranară etc., endonuclează G (EndoG) și factorul inductor al apoptozei (AIF, apoptosis inducing factor) care fără niciun intermediar, conduc spre moarte celulară programată (Kwak, 2013). De o importanță similară este și calea apoptotică asociată caspazei 12, activată de Ca^{2+} de origine endoplasmatică, convergentă căii caspazei 9 și caspazei 8, toate determinând activarea caspazei 3, cu funcție direct proapoptotică. Nu se cunoaște dacă alicina are sau nu vreun efect asupra altor proteine din familia Bcl (Bcl-2, Bcl-X_L, BID) cu rol critic în modularea/direcționarea apoptozei.

Există cercetări care demonstrează efectul neuroprotector al alicinei, inducând o rată de maturizare neuronală normală în condiții experimentale citotoxice (Li și colab., 2012) și de asemenea sunt menționate efecte modulatorie asupra funcției și structurii formațiunii hipocampice manifestate prin ameliorare comportamental-cognitivă (Zhu și colab., 2015). Acțiuni protectoare ale alicinei asupra neuronilor s-au raportat și în condiții neuroexcitotoxice (concentrații crescute de glutamat) (Liu și colab., 2015). Efectul neuroprotector al alicinei este fundamentat nu doar pe proprietățile antioxidante ale acesteia, ci și pe acțiunea

antiinflamatoare. Folosind modele experimentale de ischemie cerebrală, s-a demonstrat faptul că ciclooxigenaza-2 (COX-2) și $\text{TNF}\alpha$ sunt activați, aceștia având un rol reglator în neuroinflamația ischemică, după cum arată Yang și Chen (2008) precum și Candelario-Jalil și Fiebich (2008). Ischemia cerebrală experimentală induce deficit neurologic în grade variate de manifestare, teritorii de infarct și alterări histologice. Administrarea atât a extractelor de *Allium* (*Allium sativum*), cât și a alicinei, a condus spre diminuarea gradului de afectare cerebrală astfel că alterările neurologice au scăzut cu 61.6%, suprafața infarctizată cu 54.8%, iar alterările histologice (vacuolizări ale mielinei, neuroni hipoxici cu nucleu picnotic, focare de necroptoză) s-au diminuat cu 33.7%. Mai mult, nivelul COX-2 a marcat o scădere, alături de cel al $\text{TNF } \alpha$ (Colín-González și colab., 2011).

Mecanismul pe care l-a propus Sendl și colab., (1992), ca fiind responsabil de inhibiția COX-2 de către alicină, era construit pe interacțiunea dintre gamaglutamilcisteină și COX-2. Analiza detaliată a extractelor de *Allium* a arătat însă că gamaglutamilcisteina este complet hidrolizată în extracte, prin urmare inhibarea COX-2 nu este datorată acestei interacțiuni. Park (2009) a oferit o explicație plauzibilă față de inhibarea COX-2 de către extracte de *Allium*. Autorul a propus, ca responsabili de această inhibiție, doi compuși cu structură flavonoidică: N-feruloiltiramină și tiacremonenă care sunt regăsiți în extractele de *Allium* și acționează inhibitor asupra COX-2. Totodată, tetrahidrocarbolinele (THCB) ar mai putea fi responsabile de efectul inhibitor al extractelor de *Allium* asupra COX-2, însă această teorie rămâne să fie mai amănunțit studiată. În raport cu funcțiile neuronale, mediația colinergică deține un statut special, fiind profund implicată în procesele de memorare, învățare, vorbire, control nervos periferic, funcție neuromusculară ș.a.m.d. Totodată, deteriorarea colinergică este asociată cu tulburări comportamentale și cognitive care pot merge până la boala Alzheimer sau alte tipuri mai ușoare de demență. O cale terapeutică a acestor boli este menținerea farmacologică a unei concentrații cât mai mari

de acetilcolină (Ach) în teritoriul cerebral. Principalul mecanism prin care, utilizând substanțe medicamentoase, se poate realiza acest fapt, este blocarea acetilcolinesterazei (AchE). Această enzimă a țesutului nervos răspunde de turn-overul Ach și prezintă o izoformă hepatică și eritocitară, numită butirilcolinesterază (BuChE). S-a demonstrat că alicina are efect inhibitor asupra ambelor enzime, fiind mai puternic față de AchE (Kumar, 2015). În patologia bolii Alzheimer, AchE scade, iar BuChE crește. O strategie de inhibiție dublă a acestor enzime ar contribui la ameliorarea simptomatologiei asociate. Studiile *in chimico* au demonstrat că alicina inhibă ambele enzime într-o manieră dependentă de concentrație. Pentru AchE, IC_{50} este 0.01 ± 0.009 mg/mL ($61.62 \mu M$), iar pentru BuChE, IC_{50} este 0.05 ± 0.018 mg/mL ($308.12 \mu M$) (Kumar, 2015).

Alicina s-a dovedit a fi eficientă și în remedierea efectelor traumatismelor cerebrale. Prin sterotaxie, s-au indus leziuni în diferite zone cerebrale și s-a urmărit comportamentul neuronal în absența și prezența alicinei. Markerii urmăriți au cuprins indicatori ai apoptozei (TUNEL – *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*), deficitul neurologic (tracțiunea prehensilă, testul *beam-balancing*), stresul oxidativ și nitrozativ și markeri inflamatori. Prezența alicinei a condus spre restrângerea zonei de vecinătate cu leziunea, a diminuat stresul oxidativ și leziunile asociate acestuia, a scăzut/inhibat apoptoza neuronală (scade numărul celulelor TUNEL pozitive), a atenuat reacția inflamatorie locală și crește exprimarea eNOS (NO sintaza endotelială) și pAkt (sinonim cu PKB – protein kinaza B) (Chen și colab., 2014). Activarea Akt în condiții traumatice stă probabil la baza reducerii numărului de celule apoptotice întrucât Akt fosforilează *Bcl-2 associated death promoter* – BAD (factor proapoptotic din familia Bcl-2) care disociază din complexul Bcl-2/Bcl-X și își pierde funcția pro-apoptotică. Akt poate regla producția de NF- κ B (nu induce creșterea nivelului acestuia) care activează gene implicate în menținerea homeostaziei locale (Lodish și colab., 1999; Faissner și colab., 2006). De asemenea, o serie de derivați alilsufenici

rezultați în urma descompunerii imediate a alicinei, cum sunt: S-alil-cisteina (SAC), dialil-sulfidul (DAS), dialil-disulfidul (DADS), dialil-trisulfidul (DATS), împreună cu aliina, prezintă proprietăți inhibitorii asupra sintezei unor molecule mediatore ale stresului nitroxidativ (NO, iNOS) și ale (neuro)inflamației ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{NF-k}\beta$, MCP-1²) după cum se observă în Tabelul 1 (după Ho și Su, 2014). Tabelul 1 reflectă că dialil-trisulfidul prezintă cea mai crescută rată de inhibiție asupra moleculelor asociate stresului nitrooxidativ (NO și iNOS – NO sintaza inductibilă cu exprimare prevalent în țesutul nervos) și proceselor neuro-inflamatorii. Totodată, potențialul terapeutic al alicinei și al extractelor de *Allium* este bine conturat de multitudinea de bioactivități evidențiate pe modele experimentale pornite de la studii *in chimico* și finalizate cu studii *in vivo*.

Tabelul 1. Acțiunea inhibitoare a unor compuși alilsufenici prezenți la *Allium* asupra unor molecule implicate în stresul oxidativ și în inflamație

Molecula inhibată	Molecula inhibitoare (derivat alilsufenic)				
	SAC 1 mM	Aliină 1 mM	DAS 1 mM	DADS 0.4 mM	DATS 0.2 mM
	% de inhibiție al sintezei				
NO	24.2	35.1	28.9	62.4	94.9
iNOS	11.6	-0.2	16.2	70.2	99.7
mRNA iNOS	1.6	-16.9	-8.3	30.8	77.7
$\text{TNF}\alpha$	10.1	19.9	25.6	42.4	67.4
$\text{IL-1}\beta$	30.3	27.1	19.1	44.0	69.5
MCP-1	18.4	10	14.7	51.0	85.1
$\text{TNF}\alpha$ mRNA	16.2	-11.9	9.0	43.6	79.5
$\text{IL-1}\beta$ mRNA	5.1	-13.3	-1.0	37.9	53.2
MCP-1 mRNA	3.5	-5.7	14.5	33.5	81.6
$\text{NF-k}\beta$	8	-4.1	10.6	42.2	102.4

Legendă: SAC – S-alil-cisteină; DAS – dialilsulfid; DADS – dialildisulfid; DATS – dialiltrisulfid; NO – monoxid de azot; iNOS-NO sintaza inductibilă; mRNA-ARN mesager; $\text{TNF}\alpha$ – Tumor Necrosis Factor α ; $\text{IL-1}\beta$ – interleukina 1 β ; MCP-1 – monocyte chemoattractant protein 1; $\text{NF-k}\beta$ – nuclear factor $\text{k}\beta$.

² Monocyte Chemoattractant Protein -1

2.2.3. Mecanisme de reacție general valabile pentru compuși vegetali cu acțiune antioxidantă și imunomodulatoare

Antioxidanții cuprind o gamă largă de molecule și biomolecule care au mecanisme de reacție comune, în răspunsul sistemic, față de factorii prooxidanți, precum proteine reactive/autoreactive (hemoglobina), xenobiotice (solvenți organici, compuși medicamentoși, toxine din aer) sau generatori endogeni de radicali liberi (stresul neuropsihic, stimularea metabolică de către gluco- și mineralo-corticoizi corticosuprarenalieni). În general, radicalii liberi, formați prin diverse căi, conduc la o serie de reacții de autooxidare în lanț (Doba și colab., 1985; Pryor și colab., 1988) care inițiază etapa de propagare a autooxidării. Se disting două mecanisme principale, în acțiunea antioxidantă a unei molecule: (i) formarea unor radicali liberi, pornind de la molecula antioxidantă, care întrerup procesul de autooxidare în lanț, îndepărtând din mediul de reacție radicali alchil sau alchilperoxi care la rândul lor inițiază etapa de propagare; (ii) prevenirea de către molecula antioxidantă a intrării radicalilor peroxi- în lanțul autooxidării după cum demonstrează Suzuki și colab. (1991). În ambele mecanisme, antioxidanții acționează la nivelul perioadei de inducție a autooxidării, caracterizată prin formarea și acumularea radicalilor peroxi-. Având la bază aceste două mecanisme, se conturează patru posibile căi de reacție prin care antioxidanții de tip fenolic, aminic sau cetonic își exercită proprietățile: (i) întreruperea autooxidării în lanț (fenoli, hidrochinone); (ii) dezactivarea unor ioni metalici (salicilendiamine); (iii) dezactivatori ai radiațiilor UV (cetone aromatice) și (iv) descompunerea peroxizilor (butirați, benzilamină) (Robak și Gryglewski, 1988; Ricardo da Silva și colab., 1991).

În sistemele vii, se întâlnesc două tipuri de răspuns antioxidant: *primar* și *secundar*. Răspunsul antioxidant primar cuprinde activitatea antioxidantă a multor compuși naturali care donează un proton (H^+) către specia de radical liber intrată în reacție. De pildă, vitamina E, acidul ascorbic (vitamina C), acidul uric, tiolii sau ubichinolul prezintă acest mod

de acțiune de tip *primar* (Ames și colab., 1981). În general, compuși vegetali cu proprietăți antioxidante acționează la nivelul răspunsului antioxidant *primar* care este adesea urmat de activarea unei serii de enzime (în ordinea intrării în reacția antioxidantă: superoxid-dismutază, glutatiónperoxidază, catalază) destinate fie protecției, fie reparării unor substructuri celulare lezate de atacul speciilor reactive de oxigen și/sau azot. Activarea enzimatică reprezintă răspunsul antioxidant *secundar*. Merită menționat, însă, că s-au raportat și compuși vegetali cu acțiune prooxidantă activați fie prin fotosensibilizare/fotoionizare, fie prin cicluri redox. Exemple canonice ale acestei clase de molecule sunt alcaloizii, acidul hidrocinamic împreună cu derivații săi, tiofeni, poliacetilene sau cumarina (Cabelli și Bielski, 1983; Toda și colab., 1985).

Antioxidanții naturali de tip secundar (tioli, acidul dehidrolipoic, vitamina E, PUFA (Poly Unsaturated Fatty acids), β -carotenul, etc.) sumarizează patru clase de molecule, în funcție de acțiunea pe care o exercită (Asada și Kanematsu, 1976; Ariga și Hamano, 1990): (i) agenți reducători, (ii) *radical quenchers*, (iii) *oxygen quenchers* și (iv) agenți de complexare a ionilor metalici.

Moleculele antioxidantilor care acționează ca agenți reducători intervin în calea unor procese de oxidare, iar specia pe care o protejează este redusă, antioxidantul cedând electroni. Este cazul polifenolilor (ex. quercetin), calconelor sau vitaminei E. Tioli sau acidul dehidrolipoic sunt rapid oxidați de electrofili ca apa oxigenată, superoxizi, hidroxili, oxigen singletic sau acizi carboxilici (Brown și colab., 1991).

În cazul antioxidantilor care acționează ca *radical quenchers*, precum chinonele, β -carotenul sau flavonoidele, moleculele acestora reacționează rapid cu radicali liberi formând compuși stabili, prevenind oxidarea altor molecule cu funcții în homeostazia celulară și, de asemenea, previn inițierea reacțiilor de autooxidare după cum demonstrează Allen (1980) și Weng și Gordon (1992). Antioxidanții fenolici (ex. vitamina E) interacționează cu radicalul superoxid $[O_2]$, generând un intermediar

inactiv termodinamic numit radical fenoxil (Graf și colab., 1987). În cazul antioxidantilor care sunt cuprinși în clasa stingătorilor radicalilor liberi (*radical quenchers*), acțiunea acestora cuprinde două etape demonstrate în reacția cu oxigenul singletic: (i) stingerea fizică și (ii) stingerea chimică. Apa, beta-carotenul, PUFA, alcaloizi sau, histidina (la fungi) interacționează prin coliziune cu oxigenul singletic, urmată de transferul energiei către *antioxidantul stingător*. Acesta, la rândul său, disipează energia în mediul de reacție, sub formă de căldură, însă fără modificarea structurii moleculare a antioxidantului, procesul reprezentând stingerea fizică. În cazul stingerii chimice, compușii fenolici, vitamina E, flavonoidele, acidul ascorbic sau carmosina reacționează cu oxigenul singletic prin încorporarea acestuia în molecula antioxidantului după cum au demonstrat Burton și Ingold (1981) și Dahl și colab. (1988). Distincția între *radical quenchers* și *oxygen quenchers* este bazată pe specificitatea de reacție a antioxidantilor. De pildă, compușii fenolici, vitamina E, flavonoidele, acidul ascorbic sau carmosina funcționează chimic atât ca *radical quenchers*, cât și ca *oxygen quenchers*, dat fiind mecanismul prin care reacționează cu oxigenul singletic și alte specii reactive de oxigen precum superoxidul și peroxidul (Tajima și colab., 1983; Robak și Gryglewski, 1988). Antioxidanții pot funcționa și ca agenți de complexare a ionilor metalici (fier, cupru) implicați în reacția Fenton sau alte reacții de autooxidare. Acidul eritorbic sau EDTA se leagă de metalul aflat în stare de tranziție scăzând considerabil efectele biologice ale ionului generat. Acidul citric sau flavonoidele formează complexe stabile cu ionul Cu^{2+} ; acidul fitic reacționează cu ionii de fier reactivi formând complexe stabile numite fitați care acționează drept catalizatori ineficienți ai reacției Fenton și ca inhibitori potenți ai peroxidării lipidice (Yuting și colab., 1990).

Acțiunea imunostimulatoare a compușilor de origine vegetală se manifestă nespecific (Toma și colab., 2019) și conduce la stimularea imunității mediate celular și/sau umoral, cea din urmă fiind predominantă. După cum arată un consistent corp de lucrări (Wagner și

colab., 1999; Kanan și colab., 2007; Archana și colab., 2011; Breyer și colab., 2015; Salehi și colab., 2019), unele extracte vegetale și compuși vegetali dețin proprietăți imunostimulatoare marcate prin creșterea numărului de limfocite, stimularea transformării celulelor NK, creșterea nivelului interleukinelor 1 și 2 (Liu și colab., 2006), creșterea concentrației serice a imunoglobulinelor sau indirect, prin scăderea stresului oxidativ și a concentrației hormonilor imunosupresori precum glucocorticoizii (Rahimi și colab., 2011). În timp, numeroase cercetări farmacognostice au arătat că specii precum *Echinacea angustifolia*, *Raphanus sativus* var. *sativus*, specii din genul *Allium*, *Plantago*, florile de soc (*Sambucus flos*), măceșele (*Cynosbati fructus*), rizomii de ghimbir (*Zingiberis rhizoma*), fructele de cătină (*Hippophaë fructus*) sau florile de tei (*Tilia tomentosa*flos) sunt eficiente în stimularea nespecifică a imunității, grație compușilor polifenolici, tiolici, cumarnici, antocianici, triterpenici, flavonoidici sau glucidici pe care speciile menționate îi conțin. Cu toate acestea, studii mecanistice, privind acțiunea de tip moleculă semnal-receptor, nu s-au putut concretiza în idei universal valabile. Există studii care demonstrează faptul că o serie de glucide vegetale (fructani, manani, galactomanani) sunt imunostimulatoare (Tzianabos, 2000; Plüddemann și colab., 2007) prin faptul că mimează molecule mari de natură glucoproteică, cu efecte puternice imunostimulatoare, prin intermediul unei clase de receptori de tip *scavenger* (Urban și colab., 2000; Schäfer și colab., 2009; Arredouani, 2014; Martineau și colab., 2014). S-a pus, totodată, problema mecanismului prin care alicina și derivații acesteia exercită acțiuni imunostimulatoare având în vedere masa și volumul molecular foarte mici în raport cu situsurile de legare de pe receptorii de tip *scavenger* (SCAR B1, SCAR B2, Colec12, MARCO – **Fig. 5**) și dacă acești receptori ar putea fi implicați în calea de semnalizare responsabilă de stimularea de către alicină a imunității mediate umoral. Cercetări recente (Toma și colab., 2019) au expus, pentru prima dată, un mecanism și o cale de semnalizare prin care alicina acționează ca puternic agent imunostimulator, aceasta formând cu

glutationul redus un compus nou, numit S-alil-mercaptoglutation. Acesta poate interacționa cu receptori de tip *scavenger* a căror cale de semnalizare este convergentă, la nivelul unei tirozinkinase, cu calea de semnalizare a receptorilor de tip CD19 de la suprafața limfocitelor B, conducând astfel la creșterea sintezei și eliberării imunoglobulinelor de tip A, G și M.

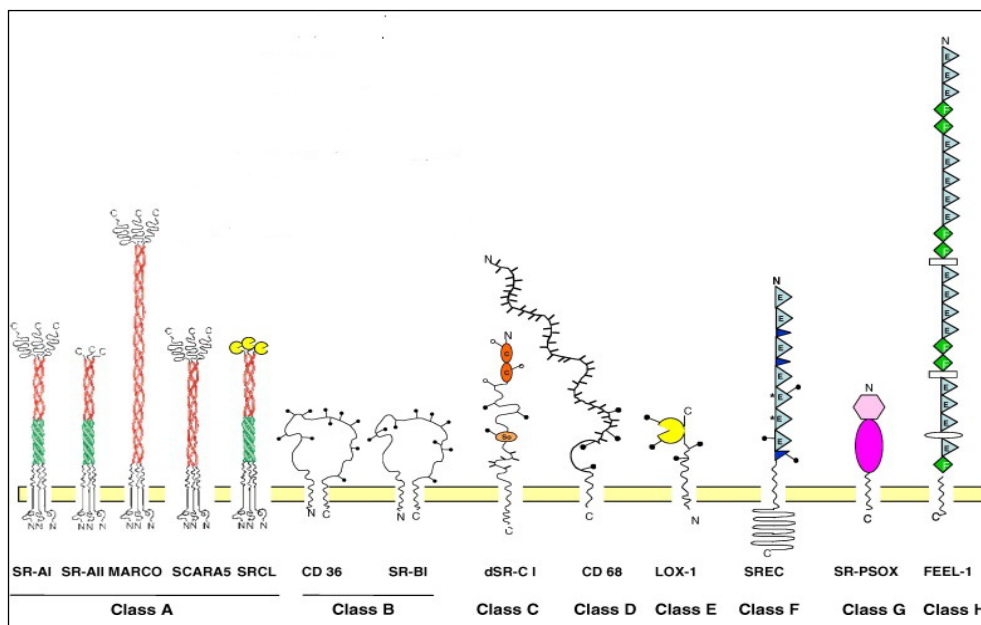


Fig. 5. Structura diferitelor tipuri de receptori de tip *scavenger* (după Plüddemann și colab., 2007).

2.3. Extracte vegetale cu proprietăți antioxidante și cu acțiune adjuvantă sau terapeutică în patologii induse experimental

2.3.1. Bioactivități la extracte vegetale – o paradigmă în fitoterapie

Fitoterapia cuprinde variate formulări farmaceutice conținând, adesea, mai mulți compuși vegetali regăsiți în forme purificate sau în extracte fluide, liofilizate vegetale, suspensii, uleiuri volatile sau ceaiuri. Orientarea fitoterapeutică pornește de la condiția fiziopatologică dată și are la orizont o gamă variată de preparate de origine vegetală la care

activitatea antioxidantă și antiinflamatoare prevalează sub aspectul efectului respectivului preparat fitoterapeutic (Ameh și colab., 2010). Compuși precum rutin, quercetin, luteolin, acizi vegetali (ex. ascorbic, citric) sau clorofila extrasă din materialul vegetal prezintă certe efecte antioxidante și antiinflamatoare, însă acești compuși se regăsesc în toate speciile din flora spontană sau cultivată cu indicații fitoterapeutice (Williamson și colab. 1996; Schultz și colab., 2001). În opinia noastră, este o eroare de orientare experimentală și una privind modelul biologic folosit în vederea stabilirii bioactivităților unui extract vegetal sau preparat fitofarmaceutic. Efectul *in vitro* sau *in vivo* al unui preparat fitofarmaceutic trebuie să se coreleze strict cu particularitatea fitochimică a speciei care a stat la baza preparatului după cum sugerează și Lopes și colab. (2018). Modelul biologic folosit nu trebuie să fie unul specific pentru stresul oxidativ, întrucât aproape toate modelele experimentale pe șobolan, care urmăresc reproducerea condițiilor specifice unei patologii, sunt asociate cu modificarea statusului redox al indivizilor din experiment.

Valorificarea unui preparat fitofarmaceutic nu trebuie, așadar, fundamentată pe acțiunea antioxidantă și/sau antiinflamatoare a respectivului preparat, ci pe acțiunea particulară a fitopreparatului, oferită de particularitatea fitochimică pe care specia de proveniență o prezintă. Numeroase cercetări demonstrează că extractele vegetale sunt antioxidante și/sau antiinflamatoare (Mandal și Rath, 2015; Unsal, 2018; Ganji-Arjenaki și colab., 2019). Această concluzie este conturată în urma folosirii unui model experimental care, la primul nivel de înțelegere, este un model pentru stres oxidativ sau inflamație (ex. intoxicația cu tetraclorură de carbon, cu clorură de aluminiu, cu ciclofosamidă, cu cisplatin, carboplatin, acetaminofenol) cu toate că modelul experimental, din punct de vedere funcțional induce cu totul alte modificări (ex. tetraclorura de carbon – steatohepatită; clorura de aluminiu – hepato, neuro și nefrotoxicoză; ciclofosfamida, cisplatinul, carboplatinul – hepatită toxică, pancitopenie, imunosupresie, glomerulonefrite; acetaminofenolul

– necroze focale la nivel hepatic, necroze tubulare renale, trombocitopenie-toate aceste patologii fiind asociate cu amplificarea stresului oxidativ). Totodată, un model experimental, organizat judicios, scos de sub influența mai multor factori simultan, întotdeauna va avea în vedere testarea separată de extract/mixtură fitofarmaceutică, a compusului sau compușilor particulari speciei studiate (ex. genul *Allium* – alicină/aliină, genul *Lamium* – iridoide de tipul shanshizidmetilesterilor, genul *Hypericum* – hipercină/hiperforină, genul *Vaccinium* – arbutozidă, genul *Plantago* – plantaină etc.).

2.3.1.1. Extracte vegetale de *Lamium*

Genul *Lamium* cuprinde 40 de specii răspândite în Europa, Asia și Africa. Genul *Lamium* aparține familiei *Lamiaceae*, din ordinul *Lamiales*, subclasa *Asteridae*, Clasa *Magnoliopsida* (Dicotyledonatae), încregătura *Magnoliophyta*, Regnul *Plantae*³; speciile comune genului sunt *Lamium album*⁴ (**Fig. 7a**), *Lamium amplexicaule*⁵ sau *Lamium maculatum*⁶. Materia primă pentru prepararea extractelor de urzică moartă albă constă în partea aeriană (*Herba Lamii albi*) sau flori (*Flores Lamii albi*). Principalele tipuri de acțiuni terapeutice ale extractelor obținute din părțile aeriene sunt cele hemostatice, expectorante, astringente, antiinflamatorii, calmante și diuretice. De asemenea, urzica moartă albă prezintă proprietăți imunostimulatoare și antihipoxice (Saleem și colab., 2019). Dintre principalele plante utilizate în fitoterapie, urzica moartă albă se remarcă cu acțiunea terapeutică în cazul anemiei feriprive și în insuficiența medulară (Petukhova și colab., 2008). Florile de *L. album* prezintă acțiuni terapeutice în cazul afecțiunilor inflamatorii ale mucoaselor, tratamentul

³ <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=LAAL>

⁴ <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=LAAL>

⁵ <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=LAAM>

⁶ <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=LAMA>

tusei, totodată fiind raportate proprietăți bactericide și bacteriostatice (Chudnicka și colab., 2005).

Spectrul larg al activităților farmacoterapeutice ale urzicii moarte albe, rezultă din complexul de substanțe active pe care le conține: flavonoide, iridoide, acizi fenolici, aminoacizi, carotenoizi, derivați clorofilici și polizaharide și beta-sisterolul. Todorov și colab. (2013) au arătat că extracțiile în cloroform din *L. album* propagat *in vivo* și *in vitro* prezintă capacitate antivirală. Extractele au inhibat semnificativ replicarea virusului *Herpes simplex* de tip 1 (HSV-1) și de tip 2 (HSV-2) în celulele MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney), fără citotoxicitate aparentă. Aceleași rezultate au arătat că *L. album* poate reprezenta o sursă interesantă de substanțe antivirale naturale. Pereira și colab. (2013a, b) au investigat efectele antioxidante și citoprotective ale extractelor etanoliche purificate de *Cytisus multiflorus*, *Lamium album* și *Thymus citriodorus*. Aceste extracte au prezentat activitate antioxidantă proeminentă, determinată cu metoda DPPH și Trolox. Utilizând un model pentru stresul chimic, indus de bicromatul de potasiu în cultură de hepatoblastom HepG2, o concentrație de 50 μg/ml de extract de *C. multiflorus*, *L. album* și *T. citriodorus* a dus la scăderea ratei producției speciilor reactive de oxigen (ROS), cu 25%, 26% și respectiv 20%, când au fost expuse la 25 μM bicromat de potasiu. În plus, extractele etanoliche purificate și amestecurile polifenolice preparate au arătat un efect citoprotectiv împotriva toxicității multiple induse de bicromatul de potasiu (Pereira și colab., 2013a).

Topouzova-Hristova și colab. (2012) au verificat efectele antitumorale *in vitro* ale extractelor de *L. album*. Rezultatele au arătat un efect antiproliferativ marcant al extractelor totale (*herba*) de *L. album*, obținute fie din plante naturale, fie din plante crescute prin tehnici de micropropagare. Zhang și colab. (2009), în studiul fitochimic al unui extract apos din vârfuri florifere de *L. album*, au identificat prezența unor iridoide antivirale, precum lamiridosinele izomerice A și B, care inhibă semnificativ replicarea virusului hepatitei C *in vitro* (Yalçın și Kaya, 2006).

Petukhova și colab. (2008) au realizat un studiu pentru a demonstra acțiunea antianemică a unui extract uleios, obținut din partea aeriană a urzicii moarte albe, care conține un complex de compuși lipofili (clorofilă, carotenoizi, steroli). Astfel, au arătat că administrarea extractului uleios de urzică moartă albă prezintă efecte antianemice în cazul anemiei hemoliticepost-hemoragice, prin efectul de stimulare medulară exercitată de către extract. Acțiunea antianemică a extractului de urzică moartă albă poate fi datorată efectelor antioxidante ale preparatelor clorofilice, cu atât mai mult cu cât, a fost demonstrat, deja, că dezvoltarea proceselor anemice este acompaniată de activarea însemnată a peroxidării lipidice. De asemenea, efectele administrării extractului uleios de urzică albă moartă în vederea restricționării dezvoltării anemiei, datorată lipsei de fier, sunt asociate în mod evident cu faptul că această plantă deține și efecte hemostatice (Petukhova și colab., 2008).

Akkol și colab. (2008) au evaluat activitățile antiinflamatorii și antinociceptive ale diferitelor extracte preparate cu metanol, diclormetan, n-butanol și apă, din părțile aeriene ale unor specii de *Lamium* din Turcia. Studiul a confirmat proprietățile antiinflamatorii și antinociceptive ale speciilor *L. garganicum* subsp. *laevigatum*, *L. garganicum* subsp. *pulchrum* și *L. purpureum* var. *purpureum*, care sunt datorate prezenței iridoidelor și compușilor fenolici. Moskova-Doumanova și colab. (2012) au arătat că extractele cloroformice și metanolice au efecte citotoxice asupra celulelor canceroase pulmonare din linia A549 și determină reducerea intratumorală a exprimării proteinelor responsabile cu adeziunea celulară (ex. NCAM, VCAM, ICAM, E-caderină). Acest fapt care deschide setul de contraindicații ale extractului de *Lamium*, extractul putând determina desprinderea celulelor tumorale și metastazarea acestora (Topouzova-Hristova și colab., 2012). *L. album* este enumerată printre plantele cu proprietăți dermatoterapeutice antiinflamatoare. Mai mult, această plantă este utilizată și în tratarea plăgilor. Pentru a verifica această ipoteză, Paduch și colab. (2008) au testat efectul extractelor metanolice, etilacetate

și heptanice de *Lamii album flos* asupra proliferării și viabilității fibroblastelor dermice umane (FDU). Efectul biologic depinde de densitatea FDU și de tipul și concentrația extractului utilizat. La o densitate de 1×10^5 FDU/ml, nu s-a observat nicio citotoxicitate a extractelor în primele 24 de ore de incubare. În intervalul 24-72 de ore de incubare, la o densitate scăzută a celulelor (2×10^4 celule FDU/ml), a fost observată o citotoxicitate crescută pentru extractele metanolice și etilacetate, la concentrații mai mari de 125 μ l/ml. La o concentrație de 25 μ l/ml, celulele rămân intacte. Stimularea proliferării fibroblastelor dermice umane de către extractul heptanic de *Lamii album flos* poate indica utilitatea sa în tratarea rănilor *in vivo* și posibilitatea utilizării sale viitoare în crearea unor preparate vegetale utilizate ca biopansamente (Paduch și colab., 2008). Unele specii din genul *Lamium* sunt utilizate, în mod tradițional, ca alimente în unele țări, cum este *L. amplexicaule*, unul din ingredientele așa-numitei „șapte ierburi ale primăverii”, o mâncare de orez consumată în mod tradițional în timpul sărbătorilor de Anul Nou, în Japonia. Uleiul obținut din semințele acestei specii prezintă proprietăți antioxidante puternice, motiv pentru care a fost propus pentru utilizarea ca supliment alimentar (Picuric-Jovanovic și colab., 2006).

În flora din Turcia, există 30 de specii de *Lamium* (Mill, 1982; Duman și colab., 2000). Printre acestea, *L. album*, *L. maculatum* și *L. purpureum* au fost raportate ca fiind utilizate în Anatolia ca tonice (sub forma de extracte sau siropuri) și pentru tratarea constipației (Baytop, 1999). În vestul Anatoliei, întreaga plantă de *L. album* și numeroase alte specii de *Lamium* sunt utilizate pentru tratarea durerilor reumatismale și ale altor afecțiuni artritice (Ozaydin și colab., 2006). Extractul floral (*flos*) este folosit ca expectorant și pentru a trata afecțiuni respiratorii, mai ales viroze cu *Parainfluenza* și bronșita (Blumenthal, 1998; van Wyk și Wink, 2004). Pe lângă efectul antiinflamator, unele dintre componentele active ale extractului de *L. album* au efecte anticolinergice și antispastice (Paduch și colab., 2008). Aceste efecte terapeutice se datorează unor mari varietăți

de componente biologice active din plantă, care nu sunt încă bine studiate, precum shanshizidmetilesterii (Pereira și colab., 2013b). Studii derulate pe o mare varietate de plante medicinale au arătat că elementele active antiinflamatorii extrase în mediu apos, includ compuși cum sunt: fenoli, alcaloizi, glicozide și carbohidrați. Cel mai probabil, taninurile din *L. album* sunt responsabile pentru efectele pozitive în utilizarea ginecologică; saponinele dau efectele benefice ale ceaiului în cazul bronșitei; alte efecte clinice ale extractelor de *L. album*, dar nu numai, se datorează unei mari varietăți de uleiuri esențiale și de glicozide solubile în etanol (Topouzova-Hristova și colab., 2012; Todorov și colab., 2013). Cu toate acestea, mecanismul de acțiune al elementelor implicate în aceste efecte nu a fost identificat în mod clar.

Dintre cele mai cunoscute specii de *Lamium*, de la noi din țară, cu utilizări medicinale, amintim *Lamium album*, și *L. purpureum*. *L. album* (urzica moartă) este o plantă frecvent întâlnită vara, la marginea pădurii, în zonele ceva mai umede ale grădinilor și pe marginile drumurilor. Frunzele sale seamănă ca aspect cu cele ale urzicii (*Urtica dioica*), însă nu au efectul urticant al acesteia, în timp ce florile sunt de culoare albă. În fitoterapia occidentală, este frecvent folosită pentru disfuncțiile hormonale ovariene, dar are efecte foarte bune și în tulburări de tranzit și în infecții intestinale, în hemoragii interne, precum și în anumite boli produse de intoxicații cu metale grele, solvenți organici sau substanțe medicamentoase (Sarac și Ugur, 2007).

Recent (Jiang și colab., 2010; Fan și colab., 2016), extractul de *L. album* a fost testat sub aspectul acțiunii sale potențial neurotrofe, pornind de la efectele cunoscute ale iridoidelor regăsite în extractul hidroetanolic. Iridoide precum shanshizidmetilesterii sunt molecule agoniste pentru receptorii *glucagon-like peptide 1* (GLP-1R), exprimați în formațiunea hipocampică, nucleii hipotalamici (în special în nucleul paraventricular și arcuat) sau enterocite (Jiang și colab., 2012). Prezența acestui grup de compuși în genul *Lamium* și în specii ca *L. album* și *L. purpureum* oferă

particularitatea fitochimică a genului, iar funcția agonistă pentru GLP-1R conduce la acțiuni trofice, neuroregenerative și neurostimulatoare ale extractului de *L. album*. Printre acestea, se numără stimularea neurosecrețiilor din cortexul frontal sau girusul dentat (Jiang și colab., 2010), acțiuni reglatoare asupra metabolismului gluco-lipidic, hepatoprotecție și creșterea clearanceului renal, după cum au arătat Yalçın și Kaya (2006) sau Roman și colab. (2016).

2.3.1.2. Extracte vegetale de *Vaccinium*

Merișorul (*Vaccinium vitis-idaea* L.) (**Fig. 7b**), este un arbust sălbatic, semilemnos, care își păstrează frunzele pe parcursul iernii și este răspândit în zonele latitudinii nordice. Genul *Vaccinium* face parte din Familia *Ericaceae*, Ordinul *Ericales*, Clasa *Magnoliopsida*, Încrângătura *Magnoliophyta*, Regnul *Plantae*⁷. Specii comune genului *Vaccinium* sunt *Vaccinium vitis-idaea* L.⁸, *Vaccinium myrtillus* L.⁹ sau *Vaccinium uliginosum* L.¹⁰ În flora României, Ericaceele sunt reprezentate de 14 specii de arbuști și subarbuști pitici, răspândiți în zona montană unde formează asociații caracteristice ca afinișuri, calunete, rodorete (Ghișa și colab., 1970; Ciocârlan, 2000). În ultimii ani, a fost introdus în cultură afinul american (*Vaccinium corymbosum* L.), pentru producția de fructe (Eck și Childers, 1992; Popescu și colab., 1992).

Dintre aceste specii, mai puțin studiat în raport cu vasta sa bioactivitate, este merișorul (*Vaccinium vitis-idaea* L.). Dacă frunzele de merișor (*Vitis idaeae folium*) sunt bine caracterizate chimic și farmacognostic, asupra fructelor acestuia, adesea se extrapolează acțiunea frunzelor. Despre frunzele de merișor, studiile arată că au un conținut de 4-6% arbutozidă (glicozidă a hidrochinonei), cu proprietăți dezinfectante

⁷ <https://eunis.eea.europa.eu/species/169466>

⁸ <https://eunis.eea.europa.eu/species/169439>

⁹ <https://eunis.eea.europa.eu/species/169475>

¹⁰ <https://eunis.eea.europa.eu/species/169479>

la nivelul căilor urinare (în cistite, pielite, nefrite), similare cu efectul frunzelor de *Arctostaphylos uva ursi* (strugurii ursului). Frunzele mai conțin hidrochinonă liberă, metilarbutozidă, fraxină, flavonoizi, taninuri, ericolină, acid chinic, derivați triterpenici (acid ursolic și oleanic), săruri de magneziu și alte săruri ale acizilor organici și vitamina C (Chukarina și colab., 2007; Jurica și colab., 2015). Comparativ cu frunzele de merișor, fructele au fost mai puțin studiate, în general studiile acestea derulându-se în ultimele trei-patru decenii. Fructele conțin antociani, care conferă culoarea roșie la maturitate a acestor fructe (Li și colab., 2011). Ele conțin, de asemenea, și proantociani, acizi organici, vitamine, flavonoide și săruri minerale (Tămaș, 1971). Deocamdată, nu s-a semnalat prezența arbutozidei în fructe, ci doar a acidului benzoic, în cantități variind între 55-310 mg/100g în fructele proaspete sau uscate (Tămaș și colab., 2012). Prin urmare, arbutozida este prezentă doar în frunzele de merișor. Acțiunea dezinfectantă a căilor urinare și antifungică a fructelor de merișor s-ar datora acidului benzoic pus în libertate cu ajutorul enzimelor digestive. Acidul benzoic posedă proprietăți antibacteriene și antifungice, manifestate mai ales la un pH acid până la diluții de 1:1000, puse în evidență față de bacilul difteric și streptococul beta-hemolitic de grup O, în concentrații de 0.04-0.08% (Vostalova și colab., 2015; Sanoner și colab., 2019).

În medicina umană, extractele alcoolice din fructe de merișor se folosesc ca antimicotice (Kryvtsova și colab., 2019), fiind mai eficiente, împreună cu acidul salicilic, în unguente. Extractele de merișor (frunze) previn o serie de afecțiuni precum: infecțiile urinare, calculoza renală (Howell, 2002), dezechilibre ale glicostatului, ateroscleroza (Hannum, 2004), viroze respiratorii. Studiile au evidențiat o puternică acțiune antivirală prin blocarea replicării virusurilor. La nivelul căilor urinare, prin administrare enterală, extractul de frunze de merișor are efecte terapeutice în cazul nefritei, pielitei, cistitei. Principala acțiune terapeutică a extractelor de frunze de merișor este cea antiseptică urinară, manifestată

prin scindarea arbutozidei și metilarbutozidei, din frunzele de merișor, în hidrochinonă respectiv metil-hidrochinonă, care alături de flavonoide, imprimă extractului atât acțiune diuretică, cât și dezinfectantă a căilor urinare (Wilson și colab., 1998; Terris și colab., 2001; Liu și colab., 2006). Studii recente (Wang și colab., 2016; Li și colab., 2018), cu privire la metabolismul arbutinei, au demonstrat că produsele fitoterapeutice care conțin arbutină, administrate pe cale orală, se regăsesc, în urină, ca hidrochinone glucuronate (70%) și sub formă de sulfați (30%), care se elimină lent, ceea ce explică acțiunea bactericidă a preparatelor pe bază de frunze de merișor. Flavonoidele și saponinele din componența frunzelor și fructelor de merișor au o puternică acțiune diuretică, deosebit de utilă în microlitiază (Pascu și colab., 2015). S-a mai demonstrat că preparatele din frunze de merișor au acțiune hepatoprotectoare în cazul administrării parenterale repetate a dexametazonei, prednisonului sau indometacinului (Nafie și colab., 2017; Santana și colab., 2018).

Extractul de frunze și fructe de merișor are: acțiune antibacteriană și la nivelul mucoasei gastrice (în infecții cu *Helicobacter pylori*) (Burger, 2000); acțiune astringentă, grație taninurilor pe care frunzele și îndeosebi fructele le conțin (adjuvant în sindroame diareice, enterocolite, colon iritabil); hipouricemiantă și antitusivă. Amestecarea în proporții egale, a extractului de fructe de merișor cu cel de fructe de ienupăr (*Juniperus communis*), amplifică efectele astringente, antitusive și dezinfectante ale merișorului (Labrecque și colab., 2006). Extractul de merișor este, de asemenea, indicat – datorită acțiunii astringente a taninurilor din frunze și fructe – în sindroame hemoragice asociate unor disfuncții menstruale sau în cazuri care implică un fibrom uterin, hemoragia fiind redusă considerabil, precum și întreg spectrul simptomatologic al acestei patologii (Vandebroek și Moerman, 2015; Selim și colab., 2019).

2.3.1.3. Extracte vegetale de *Galium*

Genul *Galium* face parte din Fam. *Rubiaceae*, Ord. *Gentianales*, Clasa *Magnoliopsida*, Încrengătura *Magnoliophyta*, Regnul *Plantae*¹¹. Acest gen cuprinde aproximativ 300 de specii răspândite pe tot Globul (Guo și colab., 2015), ocupând zone mari în Europa și Asia, de la câmpie până în etajul montan, la altitudinea de 2.500 m. În flora României, se găsesc între 28 specii (Flora RPR, 1961) și 35 specii de *Galium* (Ciocârlan, 2000). Acestea cuprind: 16 specii cu flori albe, 6 specii cu flori galbene, 2 specii cu flori verzi, 2 specii cu flori purpurii și 2 specii cu flori neprecizate. Cele mai cunoscute specii oficinale din flora spontană, din România, sunt speciile *Galium verum* L.¹² (**Fig. 7c**) și *Galium mollugo* L.¹³.

G. verum mai este cunoscută și sub alte denumiri populare: Sânziene, Drăgaică, Floarea Sfântului Ion, Încegătoare, Smântânică, Cornățel, Asprișoara, Turița lipicioasă, Beteala reginei. Alte denumiri populare, sub care se mai cunoaște această specie, sunt: Sânziene galbene (rom.), Lady's bedstraw (engl.), Caille-lait Jaune, Gaillet Jaune (fr.), Kreuz-Labkraut (ger.), podmarenic (rus.), Kolutida, Agriorisado (gr.). Produsul vegetal medicinal este *Galii veri herba* și se obține din partea aeriană recoltată în timpul înfloririi de la specia *G.verum* L. (iarba de sânziene galbene) fără rădăcini și tulpini lignificate. *Galii herba* reprezintă părțile aeriene de la cele două specii ale genului *Galium* și conține flavone, taninuri și cumarine (Chevallier, 1996; Crăciun și colab., 1997; Grigorescu și colab., 1986; Tămaș, 2005).

Dintre cele mai cunoscute specii de *Galium*, de la noi din țară, cu utilizări medicinale, amintim *Galium verum* L. și *Galium mollugo* L. Speciile de *Galium*, cunoscute popular și sub denumirea de sânziene, au proprietăți terapeutice, precum cele diuretice, depurative, ușor sedative și slab antispastice (Mitic și colab., 2014).

¹¹ <https://eunis.eea.europa.eu/species/181730>

¹² <https://eunis.eea.europa.eu/species/181730>

¹³ <https://eunis.eea.europa.eu/species/181782>

Pe lângă studiile care au vizat aspecte eco-fiziologice, anatomo-fiziologice ale plantei sau cele referitoare la obținerea de extracte cu rol fitoterapeutic, la *G. verum* s-au efectuat și studii *in vitro*, care au vizat efectul unor factori chimici (uree, azotați) asupra creșterii celulare, formării de antrachinone) și metaboliți secundari derivați din antrachinone (Strobel și colab., 1990; Ledüç și colab. 1997; Jansen și colab. 2000).

Deși la noi în țară s-au făcut o serie de studii pe specii de *Galium* (Gârd și colab. 2006; Tămaș și Stana, 2006; Demirezer și colab., 2006; Hemcinschi-Lungu și colab., 2007, 2008, 2010; Hemcinschi și colab., 2009; Stratu și colab., 2011; Milić și colab., 2013), în general, speciile de *Galium* nu au fost studiate în totalitate prin prisma efectelor biologice pe care le-ar putea avea extractele acestora.

Datorită compușilor săi chimici – iridoide (asperulozida) cu acțiune antiinflamatoare, analgezică, sedativă; flavonoide cu acțiune diuretică și antiinflamatoare; compuși fenil-propanici; taninuri cu acțiune cicatrizantă; acid citric; substanțe minerale și enzime (ex. aspartat proteaze) – planta are multiple proprietăți terapeutice: depurative, diuretice, colagoge, astringente, cicatrizante, antiinflamatoare și vulnerare (grăbește vindecarea rănilor), sudorifice, și aromatizante (Demilezer și colab., 2006; Orhan și colab., 2012; Feijoo-Siota și colab., 2018). Totodată, pentru uz intern, extractul de *G. verum* L. se utilizează ca neuroprotector și adjuvant în terapia antiepileptică (Orhan și colab., 2012; Tagarelli și colab., 2013). De asemenea, extractul de *G. verum* L. reglează circulația sângelui la vârstnici și acționează ca reglator al funcției tiroidiene (Roman și Puică, 2013; Roman și colab., 2015; Bradic și colab., 2018). Pentru uz extern, preparatele pe bază de *G. verum* L. sunt astringente, cicatrizante, antiinflamatoare și antifungice (Mitic și colab., 2014; Jan și colab., 2015).

Alături de bioactivitățile menționate, extractele alcoolice sau apoase din specii ale genului *Galium* inhibă dezvoltarea liniilor celulare provenite din carcinoame ale sferei ORL (Schmidt și colab., 2014a, b) sau

ale celor provenite din carcinoame pulmonare (Atmaca și colab., 2016). Aceiași autori (Atmaca și colab., 2018) au demonstrat efectul inhibitor al extractului de *G. aparine* L. asupra angiogenezi, scăzând exprimarea genei pentru VEGF și totodată, efectul inhibitor asupra exprimării unor citokine precum ERK ½ și IL-8.

2.3.1.4. Extracte vegetale de Malus

Genul *Malus* Mill. cuprinde 25 și 47 de specii, în funcție de cum sunt încadrați unii taxoni (ex. *M. orientalis* Uglitzk. sinonim cu *M. sylvestris* Mill ssp. *orientalis* Uglitzk.) sau unii hibrizi ai genului (Robinson și colab., 2001). *Malus sylvestris* Mill. (**Fig. 7d**) este o specie perenă, din Genul *Malus*, Fam. *Rosaceae*, Ord. *Rosales*, Clasa *Magnoliopsida*, Încrengătura *Magnoliophyta*, Regnul *Plantae*¹⁴ ale cărei fructe se utilizează, în fitoterapie, sub formă de extracte cu diferite matrici precum apă-glicerol, etanol sau apă-glicerol-etanol (Mustafa și colab., 2012). Bioactivitatea extractelor din fructe de *M. sylvestris* Mill nu este explorată în măsura în care speciile de *Lamium* sau *Galium* din capitolele anterioare au fost aprofundate din acest punct de vedere. Stojiljković și colab. (2016) au constatat că extractele de *M. sylvestris* Mill au efecte terapeutice sau adjuvante în cazul hipertensiunii arteriale (probabil prin stimularea eNOS), aterosclerozei, diabetului zaharat insulinodependent, în inflamații reumatismale și în infecții urinare (prin posibila acțiune de alcalinizare urinară). Cercetările, adesea lacunare, arată și o compoziție bogată în polifenoli, taninuri, antociani (Kondo și colab., 2002), acid rosmarinic, acid ursolic (Hagen și colab., 2007), sinensitină, 3-hidroxi-tetrametoxi-flavone (Hossain și colab., 2009), pectine, vitamina C și oligominerale (Rop și colab., 2011).

¹⁴ <https://eunis.eea.europa.eu/species/179369>

2.3.1.5. Extracte vegetale de *Hypericum*

Genul *Hypericum* aparține Fam. *Clusiaceae*, Ord. *Malpighiales*, Clasa *Magnoliopsida*, Încrângătura *Magnoliophyta*, Regnul *Plantae*¹⁵. Genul *Hypericum*, numără peste 450 de specii distribuite în Europa, America de Nord, nordul Africii și vestul Asiei, adesea folosite în medicina populară ca remediu în inflamații, infecții bacteriene sau virale și în boli gastrice (Marelli și colab., 2016). Printre speciile comune se numără *Hypericum androsaemum* L.¹⁶ sau *Hypericum perforatum* L.¹⁷ (Sunătoarea), cea din urmă fiind totodată cea mai studiată specie din genul *Hypericum* (**Fig. 7e**), grație compoziției și proprietăților farmacoterapeutice pe care le posedă. Sub formă de extract hidroalcoolic, uleios, apos sau uscat, *H. perforatum* L., încă de la începutul secolului trecut, când a fost publicat primul studiu științific legat de efectele *in vivo* ale acestei specii, folosind șobolanul alb din rasa Wistar, în care autorul (Daniel, 1935) a descris fotosensibilizarea și efectele „neuropsihologice ale pigmentului roșu fotosensibil” – numit apoi hipericină – specia devine un subiect de mare interes în fitofarmacologie (Butterweck și colab., 1997).

Fără a ne propune epuizarea subiectului aflat în continuă expansiune, vom prezenta principalele date experimentale, care conturează spectrul bioactivităților extractelor de *Hypericum*. Blascheck și colab. (2008), au descris efectele aplicării topice ale extractului de *H. perforatum* ca remediu pentru leziuni tegumentare minore, mialgie, procese ulcerative etc. După cum arată Schempp și colab. (2000), hiperforina, unul dintre compușii specifici speciei *H. perforatum*, stimulează creșterea și diferențierea keratinocitelor, iar hipericina, al doilea compus caracteristic speciei *H. perforatum* L., este un agent de fotosensibilizare care ar putea fi utilizat în tratamentul selectiv al cancerului de piele nemelanomic și/sau în cadrul terapiei fotodinamice.

¹⁵ <https://eunis.eea.europa.eu/species/173212>

¹⁶ <https://eunis.eea.europa.eu/species/173335>

¹⁷ <https://eunis.eea.europa.eu/species/173212>

Izol și colab. (2019), în contextul nefrotoxicității induse cu gentamicină, au demonstrat acțiunea reglatoare a extractului de *H. perforatum* L., asupra mediatorilor apoptozei la nivel glomerular și tubular renal.

Extractul de *H. perforatum* a fost studiat, de asemenea, în cadrul patologiei cardio-vasculare (varice, ateroscleroză, hemoragii ușoare, edeme), în erupția herpetică, psoriazis sau dermatită atopică. În 2009, European Medicines Agency a acceptat punerea pe piață a extractului standardizat de *H. perforatum* L. ca remediu natural în patologiile menționate (Gastpar, 2013; Wölflle și colab., 2014; Doğan și colab., 2019). Wölflle și colab. (2014) au descris pe larg, compoziția chimică a extractului, hidroalcoolic respectiv apos, de *H. perforatum* L. Compușii foarte lipofili caracteristici speciei sunt floroglucinolii, aflați în concentrații cuprinse între 0.2-4%, precum hiperforina (omolog al adhiperforinei). Naftodiantronele, precum hipericina, pseudohipericina, protohipericina sau protopseudohipericina se regăsesc în concentrații cuprinse între 0.06 și 0.4%. De asemenea, în grupul moleculelor lipofile din *H. perforatum* L., se regăsesc xantone, uleiuri esențiale (0.1-0.25%) cu 2-metiloctan, α -pinen și alte terpene, biflavone (precum biapigenină) și amentoflavone. În grupul moleculelor lipohidrofile, se încadrează flavonoide (concentrații cuprinse între 2-4%), precum glicozidele hiperozidei asemănătoare quercetinului, rutin, izoquercetin și quercetin, compoziție pe care și alți autori au raportat-o (Arsić și colab., 2011; Bridi și colab., 2018). Procianidinele (6-15%), precum procianidina B₂, taninurile cu schelet catechinic și mici cantități de acid clorogenic, constituie grupa de molecule hidrofile pe care *H. perforatum* L. le posedă (Maisenbacher și Kovar, 1992; Isacchi și colab., 2007). Hipericina și hiperforina rămân, însă, compușii specifici pentru *H. perforatum* L. și totodată compușii responsabili de majoritatea proprietăților farmacoterapeutice ale speciei.

Sub aspectul bioactivității extractelor de *H. perforatum*, de departe, acțiunea antidepresivă și neurotrofică (prin proprietățile neuromodulatoare și antioxidante) reprezintă subiectul celor mai multe cercetări legate de

această specie. După 50 de ani, de la prima descriere a efectului farmacoterapeutic (1935) al extractului de Sunătoare, s-a raportat pentru prima dată, acțiunea inhibitoare asupra MAO (monoaminooxidazei) a acestui extract. Studiile ulterioare (Bladt și Wagner, 1994) nu au confirmat efectul inhibitor asupra MAO al *H. perforatum*, ci doar efectul antidepresiv, comparabil cu cel al moleculelor regăsite în terapia antidepresivă canonică (ex. sertralina) (Klusa și colab., 2001). În paralel, aproximativ în aceeași perioadă cu Klusa și colab., cercetările lui Muller și colab. (1998) au demonstrat că extractul hidroalcoolic de *H. perforatum* inhibă recaptarea serotoninei, noradrenalinei și dopaminei sinaptosomale și conduce la o supresie semnificativă a exprimării receptorilor 3-adrenergici și β -HT₂ la nivel cortical, după minim 7 zile de administrare a extractului la șobolani Wistar. Aceiași autori, confirmați apoi de Ronald-Bunner și colab. (2000), Szegedi și colab. (2005) sau de Ng și colab. (2017), au arătat că hipericina nu are proprietăți antidepresive, ci doar hiperforina. Autorii menționează că hiperforina este, o moleculă cu structură de antidepresiv triciclic (**Fig. 6**), cu acțiune inhibitoare nespecifică, a recaptării serotoninei, noradrenalinei și dopaminei, la concentrații cuprinse între 80-200 nmol/L hiperforină.

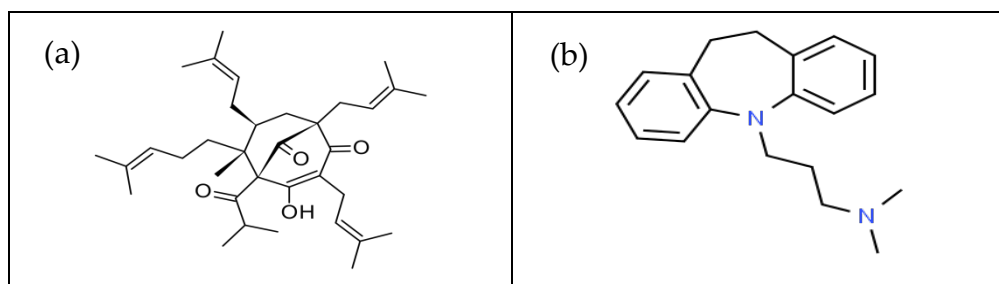


Fig. 6 Structura hiperforinei (a) și a imipraminei – antidepresiv triciclic (b).

În 2003, El-Sherbiny și colab., pe un model biologic pentru dereglarea proceselor de memorare și învățare indus prin administrarea scopolaminei (1.4 mg/kg i.p.) la șobolani Wistar cu status oxidativ debalansat, au demonstrat efectul antioxidant și psihomodulator al *H. perforatum* (doze cuprinse între 4 și 25 mg/kg i.p.). Extractul a îmbunătățit

capacitatea de memorare și învățare, proporțional cu diminuarea stresului oxidativ (scăderea malondialdehidei cerebrale și serice). Acțiunea neuromodulatoare a fost demonstrată și prin inhibarea masivă de către extractul de *H. perforatum* a exprimării IL-6, IL-1 β și TNF- α , inhibarea interleukinei 6 fiind cea mai proeminentă, sub aspectul efectului inhibitor asupra citokinelor (Thielle și colab., 1994).

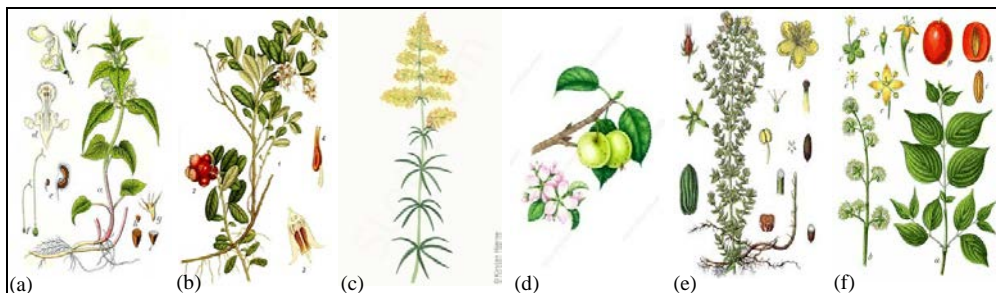


Fig. 7 Anatomia și morfologia la *L. album* L. (a)¹⁸, *V. vitis-idaea* (b)¹⁹, *G. verum* L. (c)²⁰, *M. sylvestris* (d)²¹, *H. perforatum* (e)²² și *C. mas* (f)²³.

2.3.1.6. Extracte vegetale de Cornus

Genul *Cornus*, face parte din Fam. *Cornaceae*, Ord. *Cornales*, Clasa *Magnoliopsida*, Încrengătura *Magnoliophyta*, Regnul *Plantae*²⁴ și cuprinde aproximativ 65 de specii. Din acest gen, *Cornus mas* L.²⁵ (**Fig. 7f**) și *Cornus officinalis*²⁶ prezintă un interes major în fitoterapie, ultimii 60 de ani, au cuprins o cercetare în continuă expansiune referitoare la bioactivitățile

¹⁸ <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Lamium+album>

¹⁹ https://www.wikiwand.com/en/Vaccinium_vitis-idaea

²⁰ <http://naturporten.dk/temaer/danmarks-planter/urter/item/gul-snerre>

²¹ <https://www.sciencephoto.com/media/863873/view/crab-apple-malus-sylvestris-fruit-illustration>

²² <https://pixels.com/featured/hypericum-perforatum-also-known-as-st-johns-wort-bildagentur-online.html>

²³ <https://www.pinterest.com/pin/398287160772128951/>

²⁴ <https://eunis.eea.europa.eu/species/168428>

²⁵ <https://eunis.eea.europa.eu/species/168428>

²⁶ <https://plants.sc.egov.usda.gov/core/profile?symbol=COOF3>

diferitelor forme fitofarmaceutice derivate din aceste specii. În medicina tradițională, fructele și părțile aeriene de la *C. mas* și de la *C. officinalis* au fost folosite pentru prevenția și tratamentul unei game largi de afecțiuni precum diabetul, tulburări gastrointestinale, febră, dureri reumatice, infecții ale pielii, infecții urinare, boli hepatice, boli renale, arsuri solare, tromboze sau imunodeprimare (Dinda și colab., 2016; Czerwinska și Melzig, 2018). *C. mas* are o distribuție preponderent sud-europeană și sud-vest asiatică, iar *C. officinalis* se regăsește preponderent în Asia, China, Japonia și Coreea (Czerwinska și Melzig, 2018). În general, în preparatele fitofarmaceutice, fructele de *Cornus* sunt materia primă supusă diferitelor forme de extracție (macerare, Soxhelt, repercolare la rece etc.). Gülcin și colab. (2005) au studiat activitatea antioxidantă și antiinflamatoare a extractului etanolic de *C. mas*. Datele obținute au demonstrat, o inhibare dozo-dependentă a peroxidării lipidice, cuprinsă între 75-97.5% (inhibare a peroxidării acidului linoleic), în timp ce antioxidanți standard precum butilhidroxianisol, butilhidroxitoluen și α -tocoferol au inhibat peroxidarea acidului linoleic cu 96.55%, 99.2%, respectiv 61.1%. Compoziția chimică a fructelor de *C. mas*, pentru care s-au identificat cca. 101 compuși (Dinda și colab., 2016), relevă un conținut bogat în iridoide precum acidul loganic, cornusidă și antociani precum pelargonidin-3-O-galactozidă. *C. alba*, o altă specie de interes fitoterapeutic, conține preponderent flavonoide precum quercetin și kempferol. Fructele de *C. mas* conțin antociani specifici: delfinidin-3-galactozidă, pelargonidin-3-galactozidă, cianidin-3-ramnozil-galactozidă, pelargonidin-3-ramnozil-galactozidă, cianidin-3-O-glucozidă, cianidin-3-O-rutozidă și pelargonidin-3-O-glucozidă, după cum au demonstrat Pawlowska și colab. (2010) și Swierezewska și colab. (2019). Totodată, studiile au arătat că, în compoziția extractelor hidroalcoolice din fructe de *C. mas* se regăsesc: acidul oxalic, vitamine (E, B₂, B₁, C), butirilhidrochinonă, butilhidroxianisol și butilhidroxitoluen (Eshaghi și colab., 2012).

Compoziția chimică, la *Cornus*, diferă de la genotip la genotip. În urma studierii a 12 varietăți de fructe de *C. mas*, activitatea antioxidantă (determinată cu DPPH, chelatarea Fe^{2+} , inhibarea descompunerii peroxidului de hidrogen) a fost diferită, cu toate că specia de la care proveneau fructele era aceeași (Ersoy și colab., 2011). Fructele de *C. mas* mai conțin acid cinamic, acid benzoic, catechine, taninuri (cca. 38%), urmate apoi de monoterpene, acizi organici (cca. 26%) și vitamina C (cca. 11%) (Tiptiri-Kourpeti și colab., 2019).

Efectul antiproliferativ a fost demonstrat și de Tiptiri-Kourpeti și colab. (2019) care au expus linii celulare tumorale, timp de 72h, la diferite concentrații ale extractelor de *C. mas* respectiv *C. alba*. Rezultatele au arătat că extractul hidroalcoolic de *C. mas* a manifestat un efect antiproliferativ asupra liniilor HepG2 de carcinom hepatocelular și asupra carcinomului de colon CT26. Extractul de *C. alba* a avut efectul antiproliferativ asupra liniilor celulare de tip CaCo2 și HT-29. Carcinomul pulmonar de tip MCF-7 a fost rezistent la acțiunea extractului din fructe de *C. mas* respectiv *C. alba*. Totuși, cercetările ulterioare au demonstrat faptul că extractul de *C. mas* a avut efect antiproliferativ asupra cancerului pulmonar de tip A549 cu celule mari, adenocarcinomului pulmonar MCF-7, cancerului ovarian cu celule de tip SKOV 3, adenocarcinomului de prostată PC-3, într-o manieră independentă de doză.

3.

Modele experimentale pentru studierea biologiei stresului nitrooxidativ indus prin expunere la stres neuropsihic a șobolanului din rasa Wistar

3.1. Relația dintre stresul neuropsihic și stresul nitrooxidativ

Stresul, un termen vehiculat de psihologie, medicină, biologie și chimie, în sens larg, desemnează starea sau perioada de debalansare indusă de o seamă de factori fizici sau chimici, a unui sistem aflat inițial în echilibru (sens homeostatic), în ale cărui mecanisme intervin noi evenimente (reacții chimice, structurale, comportamentale), care conduc spre o serie de modificări ale aceluși sistem, numite adaptări (Brian, 1997; Chen și colab., 2015; Toma și colab., 2016). Literatura de specialitate (Ambercombie și colab., 2003; Angulo și colab., 2004; Grissom și Bhatnagar, 2009; Alkadhi și colab., 2013) descrie stresul pornind de la evenimente moleculare (stres oxidativ, nitrozativ) și terminând cu procese cognitive (stres neuropsihic) care întotdeauna formează un tandem stres nitrooxidativ – stres neuropsihic (Bugajski și colab., 2004; Toma și colab., 2016). Legătura dintre stresul neuropsihic și stresul nitrooxidativ este structurată pe relația dintre semnalizarea hormonală asociată stresului neuropsihic (stimularea axei funcționale hipocamp – hipotalamus – hipofiză – glande suprarenale) și efectul intracelular stimulator metabolic al moleculelor semnal, cu precădere al corticosteronului (la rozătoare) și al cortizolului la om și primate nonumane (Buynitsky și

Mostofsky, 2009; Chen și colab., 2016). Corticosteroizii sunt principalii markerii de fază acută și cronică a stresului neuropsihic cărora li se adaugă, în faza acută, adrenalina și noradrenalina (Monjan și Collector, 1977; Grundmann și colab., 2010). Stresul neuropsihic, însă, amplifică eliberarea în torentul sangvin și a hormonilor sexuali și a celorlalți hormoni hiperglicemianți, în special a hormonilor tiroidieni, și stimulează totodată eliberarea peptidelor vasoactive și a hormonilor secretați de mucoasa gastrică și intestinală (Henry și colab., 2011; Jameel și colab., 2014). Efectul corticosteroizilor, se manifestă inițial, prin creșterea concentrației sangvine a glucozei, colesterolului, imunoglobulinelor (IgG, IgM), transaminazelor (AST, ALT), ca mai apoi, după cca. 72 de ore, să se instaleze efectul imunosupresor și cel proeminent catabolic al corticosteroizilor (Ohl și colab., 2000; Kesner și colab., 2008). Acest efect este marcat prin: creșterea nivelului factorilor de coagulare, a fibrinogenului; activarea lipolizei (după epuizarea tisular-dependentă a glicogenului); stimularea angiogenezei; atrofia spinelor dendritice și a arborizației neuronale (Magariños și McEwen, 1995; Magariños și colab., 1996; Münster-Wandowski și colab., 2013); modificări histologice precum mobilizarea veziculelor lipidice; hipertrofia urmată de atrofia glandelor suprarenale (în funcție de intensitatea și durata stresului) (Roman și colab., 2015). Aceste variații, ale unor parametri metabolici, sunt urmate de amplificarea fosforilării oxidative, creșterea ratei de ubiquitinare, amplificarea funcției proteasomului, stimularea transcrierii și traducerii secvențelor target în reacția corticosteronică (ex. secvența Nrf2-Keap1-ARE) (Sajdel-Sulkowska și colab., 2008) și amplificarea per ansamblu a reacțiilor biochimice intracelulare.

Evenimentele asociate creșterii nivelului sangvin al corticosteroizilor lasă în urmă, în mod firesc, radicali liberi care generează stresul nitrooxidativ. Stresul neuropsihic, generator de stres nitrooxidativ, este așadar, în primă fază, o perioadă de stimulare, ca mai apoi să devină

o perioadă de reacții degradative producătoare de energie, iar la final, să se asocieze cu o seamă de reacții adaptative morfologice și biochimice, după cum a menționat și Alkadhi (2013). Reacțiile adaptative morfologice și biochimice asociate expunerii repetate la stresul neuropsihic, stau la baza spectrului larg de patologii, care au în etiologie stresul nitrooxidativ și neuropsihic (definit de noi, drept debalansarea integrării cognitive a stimulilor externi cu caracter nou, eveniment care solicită noi mecanisme adaptative).

3.2. Expunerea animalului de laborator la stres neuropsihic

Modelul biologic cel mai frecvent utilizat pentru studierea mecanismelor stresului neuropsihic și a căilor potențial profilactice și/sau terapeutice este modelul stresului de imobilizare (*restraint stress*) a animalului de laborator. Animalul (adesea șobolanul alb Wistar) este introdus într-un holder de PET sau de sticlă unde nu poate executa nici o mișcare în afară de mișcările respiratorii. Holderul este prevăzut cu un orificiu pentru aer și cu o zonă de tamponare a umidității sau a lichidelor pe care animalul le excretă în timpul imobilizării. Metoda descrisă, este propusă de Kvetnansky și colab. (1997), iar un consistent corp de rezultate publicate, au folosit și validat această metodă (Magariños și colab., 1998; Sunanda și colab., 2000; Yau și colab., 2001; Reagan și colab., 2004; Spiers și colab., 2013; Toma și colab., 2016). Stresul de imobilizare s-a dovedit a fi aida stresului neuropsihic, sub aspectul modificărilor comportamentale, morfopatologice și biochimice pe care le induce, corelate cu numitorul comun al stresului neuropsihic și de imobilizare reprezentat de dereglarea/stimularea axei funcționale hipocamp – hipotalamus – hipofiză – glandă țință (în ordinea reactivității: glandele suprarenale, glanda tiroidă, insulele Langerhans, glandele peretelui intestinal, glandele peretelui stomacal, glandele parotide, epifiza) (Alkadhi, 2013).

3.3. Mecanisme de reglare la expunerea repetată la stres neuropsihic

Expunerea repetată la stresul de imobilizare generează o serie de reacții adaptative (de la aspecte biochimice la elemente comportamentale) apărute ca urmare a reglării neuroendocrine către care, biosistemul expus stresului, tinde să ajungă din momentul expunerii la factorii stresului. Expunerea la stresul neuropsihic prin intermediul stresului de imobilizare timp de 2-4 ore/zi de-a lungul unei perioade de minim 3 zile, a condus la concluzia noastră că eustresul ar fi reprezentat de faza acută a reacției sistemice la stres, în timp ce faza cronică a reacției la stresul neuropsihic (implicit la stresul de imobilizare) ar fi cuprinsă în noțiunea de distres. Așadar, stresul neuropsihic este fragmentat, după efectele pe care le are, în două categorii. Eustresul, prima categorie, reprezintă faza inițială (acută) în care organismul reacționează într-un mod proeminent prin creșterea parametrilor umorali precum adrenalina, corticosteronul, colesterolul, glicemia, 3-nitrotirozina, catalaza, superoxidismutaza, glutatiónperoxidaza, imunoglobulinele (Gonzalez-Lima și Cada, 1998; Darwish și colab., 2007; Gilabert-Juan și colab., 2011; Gądek-Michalska și colab. 2012; Grover și colab., 2015) și stimularea funcțiilor cognitive, a funcțiilor motrice și a rezistenței cardiovasculare. Dacă expunerea la stres continuă, în raport cu organismul, eustresul se transformă în distres, care cuprinde o seamă de modificări umorale (scăderea serică a corticosteronului, a colesterolului, a proteinelor, a enzimelor stresului oxidativ, a imunoglobulinelor – instalarea imunosupresiei corticosteronice), cognitive (tulburări ale memoriei, atenției) (Wennström și colab., 2006; Czéh și Lucassen, 2007) și dereglarea statusului cardiovascular (tensiune arterială crescută prin scăderea eliberării NO endotelial și a stimulării sistemului renină-angiotensină) (Carda și colab. 2015).

În urma trecerii prin faza de distres a organismului, modificări histologice precum distrofii granulo-vacuolare hepatice (Hao-Jie și colab., 2012), leziuni epiteliale renale și proliferarea mezangiului glomerular, scăderea stratului de mucus protector gastric, scăderea rezervelor lipidice

din corticosuprarenală (cu prevalență în zona fasciculată), atrofia glandelor suprarenale, a timusului, a tiroidei, ratatinări neuronale (Vyas și colab., 2002), proliferarea oligodendrocitelor (în special în formațiunea hipocampică – aria CA3, girus dentat) (Barres și colab., 1994; Jhonson și colab., 2009; Christian și colab., 2011; Grillo și colab., 2015; Toma și colab., 2016), proliferarea macrofagelor fixate (Kupffer, microglii, Klara și în mică măsură Liberkun) (Sugama și colab., 2007; Gaeber, 2010), scăderea limfocitelor sangvine sau fenomene de arteroscleroză incipientă sunt frecvent întâlnite în etiologia patologiilor stres-dependente (hipertensiune arterială, boli endocrine, boli digestive, etc.) (Uurlink, 1997). Reglarea așadar, implică două faze: reglarea în faza acută a stresului (manifestată prin creșterea performanțelor organismului) și reglarea în faza cronică a stresului (manifestată printr-o defensivă sistemică urmată de modificări morfolopatologice și de posibila declanșare a uneia dintre patologiile cunoscute ca fiind stres dependente).

4.

Reactivitate sistemică la șobolanul Wistar după expunere la hemoglobină și hemeritrină în formă nativă și derivatizată

4.1. Design experimental

Cercetările s-au derulat pe șobolani albi din rasa Wistar, loturi a câte 10 indivizi, femele adulte, cu vârsta de 24 de săptămâni, cu greutatea de 180 ± 30 g, generația F1. Animalele au fost obținute de la Biobaza Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca și grupate în loturi experimentale cu 12h înaintea începerii experimentului. Menținerea loturilor experimentale s-a realizat conform Directivei Consiliului UE 2010/63/UE și în acord cu Avizul nr. 1/28.02.2013 al Comisiei de Etică a Institutului de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca, filială a INCDSB București. Derularea experimentelor și a procedurilor experimentale a avut loc în condiții zooigienice corespunzătoare, în biobaza Facultății de Biologie și Geologie a Universității „Babeș-Bolyai” din Cluj-Napoca, la temperatura constantă de 20°C, ritm lumină/întuneric 12h/12h. Dieta animalelor a constat în pelet standard *Cantacuzino* pentru rozătoare mici, accesul la hrană și apă fiind nerestricționat. Experimentele au fost de tip acut, cu durata de 24 de ore, atât pentru expunerea la Hb și derivați, cât și la Hr și derivați ai acesteia. Administrarea proteinelor s-a efectuat injectabil, pe cale intravenoasă, în vena codală, volumul injectat fiind de 0.2 mL/animal. Toate loturile experimentale (corespunzătoare fiecărei molecule testate) au fost comparate cu loturile Control.

4.2. Obținerea de proteine și condiționarea acestora

Pe baza unor rezultate anterioare (Jin și colab., 2002; Hathazi și colab., 2014), hemoglobina bovină, rubreritina recombinantă din *Desulfovibrio vulgaris* (Rbr), NADH/rubredoxin oxidoreductaza din *Clostridium acetobutylicum* (NROR) au fost purificate în vederea derivatizării hemoglobinei (starterul în derivatizare). Hemeritina a fost izolată conform datelor publicate (Fischer-Fodor și colab., 2011; Hathazi și colab., 2014) și caracterizată, alături de producții de derivatizare, în termeni de greutate moleculară, afinitate pentru oxigen, rata autooxidării, reactivitate asupra stresului oxidativ etc. după cum arată datele publicate de Arkosi și colab. (2017). Hb (nHb, forma nativă) a fost polimerizată cu glutaraldehidă (GL) după metodele descrise de Buehler și colab. (2010), Scurtu și colab. (2014) și Hathazi și colab. (2014). OxyHb (1 mM) în PBS a fost mixată cu GL 8 mM și lăsată să reacționeze timp de 2h la 4°C, cu agitare mecanică lentă. Pentru obținerea unui copolimer, BSA (albumină serică bovină, fracția moleculară V) sau Rbr/NROR au fost adăugate în mediul de reacție înaintea GL, în raport molar de 2:1 (BSA/Hb), 1:30 (Rbr/Hb) și 1:1:30 (Rbr/NROR/Hb). O soluție proaspătă de borohidruă de sodiu a fost apoi adăugată (de două ori exces molar în raport cu concentrația inițială a GL) în vederea reducerii bazelor Schiff și a excesului de GL. Eductul a fost apoi dializat în tampon Tris 50 mM cu 150 mM NaCl, pH 7.4, în vederea eliminării excesului de borohidruă de sodiu, a moleculelor nelegate în polimer/copolimer și a produșilor de reacție secundari (borați și compuși asemănători). Pentru derivatizarea Hb cu oATP (ATP oxidat), s-au urmat protocoalele descrise de Deac și colab. (2011) și de Iacob și colab. (2011). Derivatizarea Hr (nHr, forma nativă) s-a efectuat în vederea obținerii polimerului de Hr (pHr), HrHSA (Human Serum Albumin) și HrRbr, după metodele descrise pentru Hb (Hathazi și colab., 2014; Scurtu și colab., 2014). Proteinele au fost manipulate în PBS

(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaH₂PO₄, pH 7.4). Tabelul 2 sumarizează tipurile de produși de derivatizare ai Hb, respectiv Hr și cadrul general de administrare al produșilor obținuți, alături de sumarul de probe biologice recoltate.

Tabelul 2. Schema generală de administrare a produșilor de derivatizare și a formelor native ale Hb și Hr

Primer	Derivat	mL adm.	Calea de adm.	Timp de reacție	Probe recoltate
Hb	nHb	0.2 mL	intravenoasă	24h	sânge integral, plasmă, ser, ficat, rinichi, splină
	HbGL				
	HbBSA				
	HbRbr				
	HbRbrNROR				
	HboATP				
Hr	nHr	0.2 mL	intravenoasă	24h	sânge integral, plasmă, ser, ficat, rinichi, splină
	pHr				
	HrHSA				
	HrRbr				
Control		-	-	-	sânge integral, plasmă, ser, ficat, rinichi, splină

Legendă: Hb – hemohlobină; Hr – hemeritrină; nHb – hemoglobină nativă; HbGL – hemoglobină polimerizată cu glutaraldehidă; HbBSA – hemoglobină copolimerizată cu BSA; HbRbr – hemoglobină copolimerizată cu Rbr; HbRbrNROR – hemoglobină copolimerizată cu Rbr și NROR; HboATP – hemoglobină copolimerizată cu oATP; nHr – hemeritrină nativă; pHr – hemeritrină polimerizată cu glutaraldehidă; HrHSA – hemeritrină copolimerizată cu HSA; HrRbr – hemeritrină copolimerizată cu Rbr.

4.3. Protocoale experimentale

Grupurile experimentale corespunzătoare fiecărei molecule testate și anume: nHb, HbGL, HbBSA, HbRbr, HbRbrNROR, HboATP, nHr, pHr, HrHSA, HrRbr alături de loturile Control au fost supuse acelorași analize, recoltarea probelor făcându-se sub neuroleptanalgezia animalelor cu un amestec ketamină-xilazină (60 mg ketamină + 7.5 mg xilazină/kg corp). S-au efectuat analize hematologice, biochimice (ser, plasmă) și histochimice (depozitele de feritină din ficat, splină și rinichi). **Tabelul 3**

sumarizează parametri determinați la grupurile experimentale și cele de Control.

Tabelul 3. Tipurile de determinări, metodele folosite și parametri determinați pentru grupurile experimentale și cele Control, în urma administrării Hb/Hr și a derivaților acestora.

Tip analiză	Tip probă	Metodă	Parametri determinați
Hematologie	sânge integral (tub EDTA2K)	analiză hematologică în flux	LYM, WBC, GRA, GRA%, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, PLT, PCT
Biochimie	sânge integral (seringă heparină)	electrochimică	Na ⁺ , K ⁺ , pH, pCO ₂ , pO ₂ , cHCO ₃ ⁻ , BE(ecf), BE(b)
	ser	UV-vis	CAT, TBARS, TP, Fe ²⁺ , PO ₄ ³⁻ , Ca ²⁺ , glucoză, transferină, creatinină, uree
		turbidimetrică	IgA, IgG, IgM, CRP, C3C
	plasmă (tub citrat)	turbidimetrică	fibrinogen, PT, aPTT
Histochimie	țesut	Histochimică – col. Pearls	ficat, splină, rinichi

Legendă: LYM – limfocite; WBC – leucocite; GRA/GRA% – numărul și % granulocitelor; RBC – eritrocite; HGB – hemoglobină; HCT – hematocrit; MCV – volum corpuscular mediu; MCH – hemoglobin corpuscular medie; PLT – trombocite; PCT – trombocrit; CAT – catalază; TBARS – thiobarbituric acid reactive species; TP – protein totale; Fe²⁺ – ionul fier divalent; PO₄³⁻ – ionul fosfat; Ca²⁺ – ionul calciu; Na⁺ – ionul sodiu; K⁺ – ionul potasiu; pCO₂ – presiunea parțială a CO₂; pO₂ – presiunea parțială a O₂; cHCO₃⁻ – concentrația de bicarbonat/rezerva alcalină; BE(ecf) – excesul de baze din fluide extracelulare; BE(b) – excesul total de baze; IgA/IgG/IgM – imunoglobulina A, G, M; PT – timpul de protrombină; aPTT – timpul de tromboplastină parțial activată.

4.3.1. Analiză hematologică în flux

Sângele recoltat pe EDTA2K 4% (sarea dipotasică a acidului etilendiaminotetraacetic), 50 µL/tub recoltare, desicat în prealabil, a fost supus analizei hematologice, folosind un analizor automat de tip Abacus Diatron. Acesta emite un fascicul laser prin dreptul căruia trece fluxul de probă (sânge integral) împreună cu reactivul specific de diluție și liză. Astfel, se măsoară diametre celulare (eritrocite, leucocite și trombocite), se cuantifică numărul de celule și se determină concentrația hemoglobinei sangvine. Aparatul calculează indicii eritrocitari (MCH, MCV, MCHC,

RDVs, RDWcw, HCT), leucocitari (GRA%, LYM%) și trombocitari (PDW, PCT, MPV, PDWs, PDWcv) derivați.

4.3.2. Metode electrochimice în flux

Folosind tehnologia SmartCard, care se bazează pe metode electrochimice, s-au determinat presiunile parțiale ale gazelor respiratorii, pH-ul sangvin, excesul de baze (BE) și bicarbonatul (cHCO_3^-). Presiunea parțială a CO_2 (pCO_2) a fost măsurată prin potențimetrie, folosind un electrod Severinghaus modificat. Acesta este reprezentat de suprafața unui electrod de aur, acoperită cu un strat interior, care conține quinhidronă, bicarbonat de sodiu și anhidrază carbonică, iar la exterior, o membrană permeabilă pentru dioxidul de carbon. Potențialul format la nivelul membranei este direct proporțional cu concentrația dioxidului de carbon dizolvat, pe baza ecuației lui Nernst. Presiunea parțială a oxigenului (pO_2) este măsurată prin amperometrie, folosind un senzor Clarke modificat, care cuprinde o suprafață catodică de aur, acoperită cu o membrană permeabilă pentru oxigen. Intensitatea curentului de reducere a oxigenului este proporțională cu concentrația dizolvată a oxigenului. pH-ul sangvin este măsurat cu un electrod de pH cu membrană de sticlă, iar pe baza valorilor pH-ului și pCO_2 , este calculată automat rezerva alcalină (cHCO_3^-), prin ecuația Henderson-Hasselbach (Toma și colab., 2016).

4.3.3. Metode spectrofotometrice

Metodele spectrofotometrice au fost folosite pentru determinarea activității catalazei, pentru cuantificarea unor ioni (calciu, fier, fosfat) sau a unor markeri metabolici (creatinina, uree, acid uric, malondialdehida (TBARS), proteine totale, colesterol). Tehnicile folosite au fost bazate pe spectroscopia UV-vis, cu ajutorul căreia se corelează o reacție de culoare apărută în urma unei reacții specifice (relație direct proporțională) sau

stingerea semnalului unei anumite molecule (relație invers proporțională), cu concentrația moleculei de interes/de dozat (Toma și colab., 2016; Toma și colab., 2018).

4.3.4. Metode turbidimetrice

Metodele turbidimetrice sunt aplicate în vederea determinărilor parametrilor de coagulare și a unor parametri imunologici. În primul caz, se măsoară timpul necesar apariției turbidității (semnal de coagulare) pentru PT și aPTT. Determinarea fibrinogenului se realizează corelând turbiditatea apărută în probă, cu concentrația (mg/dL) fibrinogenului. În al doilea caz (analizele imunologice), cuantificarea fracțiunilor imunoglobulinelor (IgA, IgG, IgM) și proteinelor de fază acută (CRP, C3) se bazează pe reacția antigen-anticorp, în urma căreia, apare o turbiditate direct proporțională cu mg/dL imunoglobulina, respectiv proteine de fază acută (Toma și colab., 2016; Toma și colab., 2018).

4.3.5. Metode histochimice

Prin metodele histochimice, se aplică asupra țesuturilor, principiile de determinare pentru diferite molecule sau compuși ionici, regăsite în tehnicile biochimiei sau chimiei analitice. Colorația Pearls este destinată evaluării depozitelor tisulare de fier, sub forma feritinei. Țesutul, fixat în formaldehidă neutră 10%, este histoprocesat și infiltrat cu parafină. Blocurile de parafină se secționează la grosimi cuprinse între 3-7 μm . Secțiunile se hidratează și se incubează cu un amestec, în părți egale, de acid clorhidric 1M : ferocianură de potasiu 5%, timp de 30 minute. Secțiunile, apoi, se clătesc cu apă distilată și se pot colora cu un colorant nuclear negru sau roșu (adesea se folosește roșu neutru sol. apoasă 1%). Secțiunile se scot după ultima baie de xilen și se montează în mediu de montare sintetic. Depozitele de fier apar colorate în nuanțe de albastru (reacția hexacianoferatului de potasiu, în mediu acid, cu ionii de fier, cunoscută și ca Reacția Albastrului de Berlin) (Toma și colab., 2016; Toma și colab., 2018).

4.3.6. Analiza statistică

Toate analizele statistice au fost efectuate folosind software-ul GraphPad Prism, versiunea 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Rezultatele au fost exprimate ca medie \pm eroarea standard a mediei (SEM). Datele au fost supuse ANOVA urmată de testul Bonferroni. Valoarea lui p asociat testului post-hoc Bonferroni, mai mică de 0.05, a fost considerată semnificativă statistic (Toma și colab., 2016; Toma și colab., 2018).

4.4. Reacție oxidativă la modelul experimental, după administrarea hemoglobinei și hemeritrinei

Expunerea șobolanului alb din rasa Wistar la forme native și derivatizate ale Hb, respectiv Hr, a indus un declin redox semnificativ la grupul nHb, HbRbr, HboATP după cum se poate observa în **Tabelul 4**, unde valorile activității catalazei serice (CAT) au fost crescute semnificativ ($p < 0.05$). În tandem cu direcția de creștere a CAT, indicatorul lipoperoxidărilor membranare (TBARS) a manifestat creșterea concentrației față de Control la loturile nHb, HbBSA, HbRbr, HbRbrNROR și HboATP ($p < 0.05$). Totodată, TBARS au fost crescute și în raport cu HbGL, controlul pozitiv al acestui studiu, astfel că loturile nHb, HbBSA, HbRbr, HbRbrNROR și HboATP au avut valori ale TBARS cuprinse între 1.77 ± 0.01 nmol/mL și 2.19 ± 0.08 nmol/mL, după cum este redat în **Tabelul 4** (Toma și colab., 2016).

Tabelul 4. Statusul stresului oxidativ la Control și grupurile experimentale, reflectat de catalază și speciile reactive cu acidul tiobarbituric. Valorile sunt exprimate ca medie \pm SEM.

	Control	nHb	HbGL	HbBSA	HbRbr	HbRbrNROR	HboATP
CAT (U/mL)	118.5 ± 16.1	279.7 $\pm 49.2^*$	289.7 ± 73.7	287.4 ± 95.0	262.7 $\pm 8.3^*$	343.90 ± 148.8	238.9 $\pm 4.3^*$
TBARS (nmol/mL)	1.74 ± 0.03	1.77 $\pm 0.01^{*#}$	1.79 $\pm 0.02^*$	1.80 $\pm 0.01^{*#}$	2.19 $\pm 0.08^{*#}$	2.16 $\pm 0.05^{*#}$	2 $\pm 0.04^{*#}$

* Semnificativ în comparație cu lotul Control, la $p < 0.05$

Semnificativ în comparație lotul HbGL, la $p < 0.05$.

După expunerea biosistemului la Hr și derivații acesteia, balanța redox a fost, de asemenea influențată în sensul creșterii semnificative ($p < 0.05$) a activității CAT și a peroxidării lipidelor membranare, comparativ cu lotul Control. **Tabelul 5** sumarizează valorile CAT respectiv TBARS la Control și grupurile de animale expuse la nHr, pHr, HrHSA și HrRbr. Valorile CAT sunt cuprinse în intervalul 626.4 ± 5.7 U/mL – 635 ± 2.9 U/mL, cu creșterea semnificativă la lotul HrRbr (635 ± 2.9 U/mL, $p < 0.05$) în timp ce la lotul Control valoarea CAT a fost de 614.6 ± 11.5 U/mL (Toma și colab., 2016).

Tabelul 5. Valorile CAT și TBARS la lotul Control și la grupurile experimentale expuse Hr și derivaților acesteia. Valorile sunt exprimate ca medie \pm SEM.

	Control	nHr	pHr	HrHSA	HrRbr
CAT (U/mL)	614.6 ± 11.5	629.9 ± 4.2	633.4 ± 2.7	626.4 ± 5.7	$635 \pm 2.9^*$
TBARS (nmol/mL)	2.2 ± 0.06	2.4 ± 0.08	2.4 ± 0.07	$2.52 \pm 0.12^*$	2.3 ± 0.06

* Semnificativ în comparație cu lotul Control, la $p < 0.05$

În mod similar, peroxidarea lipidică membranară a manifestat o creștere la loturile expuse Hr și derivaților acesteia, însă doar creșterea TBARS la lotul HrHSA (2.52 ± 0.12 nmol/mL) a avut semnificație statistică ($p < 0.05$) în raport cu lotul Control (2.2 ± 0.06 nmol/mL). Raportat la statusul oxidativ, și în corelație cu reacția imună sistemică, echilibrul acido-bazic, evaluat prin cuantificarea presiunilor parțiale ale gazelor respiratorii, prin determinarea rezervei alcaline și a pH-ului sangvin a manifestat ușoare variații, fără însă să conducă spre un tablou preclinic patologic sau incompatibil cu viața. În **Tabelul 6** sunt prezentate valorile pH, pO_2 , pCO_2 , $CHCO_3^-$, BE(ecf) și BE(b) la Control și grupurile tratate cu Hb și produșii de derivatizare ai acesteia (Toma și colab., 2016).

Tabelul 6. Valorile parametrilor echilibrului acido-bazic la lotul Control și la grupurile experimentale expuse la Hb și produșii de derivatizare ai acesteia. Valorile sunt exprimate ca medie \pm SEM.

	Control	nHb	HbGL	HbBSA	HbRbr	HbRbrNROR	HboATP
pH	7.36 ± 0.01	7.43 $\pm 0.01^{***}$	7.43 $\pm 0.01^{***}$	7.43 $\pm 0.01^{***}$	7.46 $\pm 0.01^{***}$	7.45 $\pm 0.01^{***}$	7.46 $\pm 0.01^{***}$
pCO ₂ (mmHg)	42.93 ± 1.35	38.50 $\pm 0.64^*$	37.88 $\pm 1.09^{**}$	39.50 $\pm 0.92^*$	40.93 ± 0.91	38.83 $\pm 0.99^*$	39.73 ± 0.42
pO ₂ (mmHg)	39.34 ± 1.56	45.81 $\pm 0.96^{**}$	44.76 $\pm 0.73^{**}$	47.12 $\pm 1.05^{**}$	42.49 ± 1.71	43.68 $\pm 1.65^*$	45.32 $\pm 1.23^{**}$
cHCO ₃ (mmol/L)	26.03 ± 0.30	25.50 ± 0.55	25.80 ± 0.34	26.10 ± 0.50	26.27 ± 0.89	26.05 ± 0.66	26.10 ± 0.44
BE(ecf) (mmol/L)	0.72 ± 0.21	0.20 ± 0.32	1.80 $\pm 0.16^{**}$	1.30 ± 0.51	3.50 $\pm 0.40^{***}$	1.07 ± 0.53	2.15 $\pm 0.54^*$
BE(b) (mmol/L)	1.27 ± 0.31	0.97 ± 0.31	1.88 ± 0.23	1.05 ± 0.37	2.73 $\pm 0.59^*$	2.66 $\pm 0.24^{**}$	2.72 $\pm 0.55^*$

* Semnificativ în comparație cu lotul Control, la $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Administrarea nHb și a tuturor produșilor de derivatizare obținuți a condus la o creștere semnificativă a pH sangvin (tendință de alcalinizare) ($p < 0.001$), alături de creșterea punctiformă semnificativă a pCO₂ ($p < 0.01$) și a pO₂ ($p < 0.01$), fără modificarea semnificativă a rezervei alcaline (cHCO₃⁻). Excesul de baze din fluidele extracelulare sugerează încă o dată că, la loturile HbGL, HbRbr și HboATP, este prezent un fenomen de alcalinizare, reflectat și de variațiile pH. Creșterea pO₂ la loturile nHb, HbGL, HbBSA, HbRbrNROR și HboATP arată eficiența acestor molecule sub aspectul transportului oxigenului, într-un mimetism față de Hb funcțională endogenă (Toma și colab., 2016).

Influența derivaților Hr asupra echilibrului acido-bazic (Tabelul 7) s-a dovedit a fi mai scăzută decât în cazul Hb și produșilor de derivatizare ai acesteia. În mod similar setului de molecule pe bază de Hb, derivații Hr conduc spre o alcalinizare sangvină observată la lotul HrHSA ($p < 0.001$) și la HrRbr ($p < 0.001$), pH-ul sangvin la aceste loturi fiind de 7.41 ± 0.01 , în timp ce la lotul Control a avut valoarea de 7.38 ± 0.01 . Creșterea pH la aceste loturi este susținută de BE(ecf) ($p < 0.001$) și BE(b) ($p < 0.01$) în cazul

HrHSA și de BE(b) ($p < 0.001$) în cazul HrRbr. Presiunea parțială a oxigenului (pO_2) a fost crescută, la loturile pHr, HrHSA și HrRbr ($p < 0.001$), ceea ce sugerează că, aceste molecule derivatizate nou sintetizate au fost eficiente în transportul gazelor respiratorii, având performanțe comparabile cu setul de molecule pe bază de Hb (Toma și colab., 2016).

Tabelul 7. Parametrii echilibrului acido-bazic la Control și loturile tratate cu Hr și produșii de derivatizare ai acestora. Valorile sunt exprimate ca medie \pm SEM.

	Control	nHr	pHr	HrHSA	HrRbr
pH	7.38 ± 0.01	7.37 ± 0.01	7.38 ± 0.01	7.4 ± 0.01 ***	7.4 ± 0.01 ***
pCO_2 (mmHg)	44.9 ± 1.2	46 ± 1.2	$48.7 \pm 0.8^*$	43.3 ± 1.3	44.5 ± 1
pO_2 (mmHg)	37.1 ± 0.7	40.2 ± 2	42 ± 0.2 ***	42.5 ± 1 a***	42.2 ± 0.7 ***
$cHCO_3^-$ (mmol/L)	27 ± 0.3	26.6 ± 0.4	$28 \pm 0.4^*$	27.4 ± 0.5	26.7 ± 0.6
BE(ecf) (mmol/L)	1 ± 0.3	1.2 ± 0.2	$3.3 \pm 0.4^{**}$	$2.6 \pm 0.3^{**}$	2 ± 0.7
BE(b) (mmol/L)	0.8 ± 0.2	0.5 ± 0.2	$1.9 \pm 0.3^*$	$2.3 \pm 0.2^{***}$	$2.9 \pm 0.5^{***}$

* Semnificativ în comparație cu lotul Control, la $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

4.5. Reacție imună sistemică, la modelul experimental, după administrarea hemoglobinei și hemeritrinei

După cum se va demonstra în capitolele care urmează, între stresul oxidativ și reacția imună există o relație biunivocă și de inversă proporționalitate. Așa cum s-a arătat în *Fundamentele teoretice* ale prezentei lucrări, Hb respectiv Hr sunt proteine care, în forma lor acelulară, au acțiune prooxidantă. Unul dintre obiectivele derivatizării Hb/Hr cu diverse alte molecule (Rbr, NROR, oATP, GL, HSA, BSA) a urmărit reducerea caracterului prooxidant al Hb, respectiv Hr, proteine care stau la baza unor preparate cunoscute ca substitute sangvine. Prin reducerea caracterului prooxidant, se reduce și caracterul imunogen, prin diminuarea generării ROS/NOS și susținerea sintezei imunoglobulinelor, sinteză inhibată de radicalii liberi. Evaluarea răspunsului imun sistemic, după administrarea Hb/Hr și a produșilor de derivatizare ale acestora, s-a

concentrat în monitorizarea hemogramei și a principalilor markeri imunologici de fază acută (CRP, C3C, imunoglobulinele, parametri de coagulare). Modelul experimental expus la aceeași doză de preparat proteic, pe bază de Hb sau Hr, a manifestat per ansamblu, o reacție imună moderată, ceva mai proeminentă în cazul expunerii la setul Hr. **Tabelul 8** prezintă variațiile parametrilor hemogramei, după 24h de la administrarea Hb și a derivaților acesteia. Sângele supus analizei a fost recoltat din plexul venos retroorbital, în tuburi pretratate cu EDTAK₂. **Tabelul 9** sumarizează valorilor determinate ale imunoglobulinelor serice (A, G, M), sistemului complement C3C, proteinei C reactive și ale factorilor de coagulare (fibrinogen, PT și aPTT), la lotul Control și la grupurile experimentale, cărora li s-a administrat setul de molecule pe bază de Hb (Toma și colab., 2016).

În urma administrării intravenoase a produșilor de derivatizare ai Hr, tabloul hematologic, imunologic și coagulometric a prezentat o serie de diferențe. Cele mai proeminente au fost, sub aspectul amplitudinii reacției imune umorale, asociate cu creșterea valorilor factorilor de coagulare și a trombocitelor. În **Tabelul 10** sunt prezentate valorile parametrilor hemogramei la lotul Control și la grupurile experimentale expuse Hr și derivaților acesteia. **Tabelul 11** sumarizează valorile parametrilor imunologici și de coagulare, determinați la Control și la grupurile experimentale expuse la Hr și derivații acesteia (Toma și colab., 2018).

Tabelul 8. Parametrii hematologici la Control și la grupurile experimentale expuse la Hb și produșii de derivatizare ai acesteia. Valorile sunt exprimate medie \pm SEM (Toma și colab., 2016)

	Control	nHb	HbGL	HbBSA	HbRbr	HbRbr NROR	HboATP
LYM (10 ⁹ /L)	4.8 \pm 0.06	5.4 \pm 0.51	4.8 \pm 0.26	3.9 \pm 0.08***	4.3 \pm 0.06***	4.5 \pm 0.06***	4.3 \pm 0.27
WBC (10 ⁹ /L)	6.6 \pm 0.08	5.8 \pm 0.40	6 \pm 0.30	5.1 \pm 0.05***	6.9 \pm 0.31	6.6 \pm 0.08	6.2 \pm 0.08*
GRA (10 ⁹ /L)	1.4 \pm 0.02	1.5 \pm 0.05*	1.5 \pm 0.06	1.5 \pm 0.10	1.5 \pm 0.12	1.7 \pm 0.04**	1.1 \pm 0.01***

	Control	nHb	HbGL	HbBSA	HbRbr	HbRbrNROR	HboATP
GRA %	18 ± 0.45	18.8 ± 0.89	20.6 ± 0.67*	19.7 ± 0.26*	20 ± 0.90	25.3 ± 0.24***	21.9 ± 0.53**
RBC (10 ¹² /L)	8.6 ± 0.04	8.9 ± 0.08*	9.7 ± 0.10***	9.6 ± 0.07***	9.6 ± 0.09***	9.8 ± 0.02***	9.1 ± 0.13*
HGB (g/L)	154.5 ± 1.65	162.8 ± 1.94**	167.1 ± 1.16***	168.6 ± 0.40***	169 ± 1.32***	169.6 ± 0.97***	159.2 ± 0.75*
HCT (%)	47 ± 0.34	50.6 ± 0.47***	51 ± 0.30***	51.7 ± 0.35***	50.7 ± 0.44***	50.6 ± 0.27***	49.8 ± 1.09**
MCV (fL)	54 ± 0.31	55.2 ± 0.80	52.2 ± 0.73	51.75 ± 0.48	54 ± 0.41	53 ± 0.45	52.2 ± 0.73
MCH (pg)	18.1 ± 0.13	18.24 ± 0.20	17.4 ± 0.15	17.10 ± 0.18	17 ± 0.23	17 ± 0.14	17.6 ± 0.10
PLT (10 ⁹ /L)	542.2 ± 17.03	1070.6 ± 11.02***	1033 ± 42.70***	1000.2 ± 7.80***	1025.6 ± 5.20***	895.3 ± 18.00***	1007.6 ± 2.33***
PCT (%)	0.4 ± 0.02	0.7 ± 0.01***	0.7 ± 0.03***	0.6 ± 0.02***	0.7 ± 0.01***	0.7 ± 0.02***	0.7 ± 0.01***

* Semnificativ în comparație cu lotul Control, la $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$); valori de referință: LYM (1.5-7.7), WBC (5.5-19.5), GRA (2.5-14), GRA% (35-80), RBC (5-10), HGB (80-150), HCT (24-45), MCV (12.5-17.5), MCHC (300-360), PLT (300-800), MPV (12-17).

Tabelul 9. Parametrii imunologici și de coagulare la Control și la grupurile experimentale expuse la Hb și produșii de derivatizare ai acesteia. Valorile sunt exprimate medie ± SEM (Toma și colab., 2016).

	Control	nHb	HbGL	HbBSA	HbRbr	HbRbrNROR	HboATP
IgA (mg/dL)	1 ± 0.26	6.6 ± 0.18***	8.5 ± 0.50***	6.3 ± 0.88***	7.3 ± 0.39***	6 ± 1.15***	8.2 ± 0.25***
IgG (mg/dL)	70 ± 4.38	90.8 ± 2.33**	206.7 ± 3.71***	162 ± 13.17***	277.2 ± 7.01***	230.1 ± 9.50***	202.5 ± 8.61***
IgM (mg/dL)	19 ± 1.22	64.3 ± 3.01***	57 ± 4.06***	47 ± 5.72**	30.2 ± 0.49***	54 ± 3.21***	60.7 ± 0.88***
C3C (mg/dL)	54.5 ± 2.80	54.6 ± 16.51	55.5 ± 4.94	29.7 ± 3.17***	37.5 ± 5.98*	66.4 ± 1.12**	70.6 ± 10.34
CRP (mg/dL)	41.5 ± 1.83	242.3 ± 10.31***	254.8 ± 18.35***	197.3 ± 8.85***	218.3 ± 15.19***	333.4 ± 20.73***	78 ± 3.70***
Fibrinogen (mg/dL)	80.6 ± 3.11	213.2 ± 6.47***	172 ± 3.11***	298.4 ± 11.51***	155.6 ± 2.42***	304 ± 7.38***	261.2 ± 6.73***
PT (s)	10.6 ± 0.24	10 ± 0.16*	9.9 ± 0.15*	10.4 ± 0.21	10.6 ± 0.13	10 ± 0.16*	10.3 ± 0.14
aPTT (s)	16.9 ± 0.53	16.8 ± 0.41	16 ± 0.23	15.9 ± 0.60	15.8 ± 0.10	15.8 ± 0.18	16.4 ± 0.34

* Semnificativ în comparație cu lotul Control, la $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Tabelul 10. Parametrii hematologici la Control și la grupurile experimentale expuse la Hr și produșii de derivatizare ai acestora. Valorile sunt exprimate medie \pm SEM

	Control	nHr	pHr	HrHSA	HrRbr	Referințe
WBC ($10^9/L$)	5.1 ± 0.2	$10 \pm 0.6^{***}$	$6.8 \pm 0.1^{**}$	$4 \pm 0.1^{**}$	$6.5 \pm 0.3^{**}$	1.98 - 11.06
LYM ($10^9/L$)	4.3 ± 0.1	$5.90 \pm 0.72^*$	$5.3 \pm 0.3^{**}$	$2.5 \pm 0.2^{***}$	4.4 ± 0.3	1.19 - 9.45
GRA ($10^9/L$)	0.9 ± 0.04	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.10	0.9 ± 0.04	0.9 ± 0.2	0.1 - 5.4
GRA %	20.1 ± 0.8	20.8 ± 0.8	19.8 ± 1	20.3 ± 1	18 ± 1.2	2 - 31
RBC ($10^{12}/L$)	7.6 ± 0.08	7.8 ± 0.1	7.9 ± 0.2	$8.2 \pm 0.2^*$	$8.20 \pm 0.1^*$	7.62 - 9.99
HGB (g/L)	146.2 ± 1.8	147.6 ± 2.5	146.1 ± 3.6	141.5 ± 2.3	150 ± 0.1	13.6 - 17.4
HCT (%)	51 ± 0.7	50.8 ± 1	51.5 ± 0.9	51.6 ± 0.9	$53.6 \pm 0.6^*$	38.5 - 52
MCV (fL)	66.2 ± 0.4	65.2 ± 0.6	66.1 ± 1	$64 \pm 1^*$	65.7 ± 0.8	46.3 - 56.2
MCH (pg)	18.8 ± 0.2	18.4 ± 0.2	18.3 ± 0.3	17.3 ± 0.4	18.3 ± 0.2	16.3 - 19.5
PLT ($10^9/L$)	1067.6 ± 24.3	$1353 \pm 150.2^*$	$1800.8 \pm 152.2^{***}$	$2332.5 \pm 87.5^{***}$	$1723.2 \pm 287.4^*$	574 - 1253
PCT (%)	0.7 ± 0.04	$0.9 \pm 0.01^*$	$1.3 \pm 0.2^{***}$	$1.4 \pm 0.06^{***}$	$1.2 \pm 0.1^{***}$	-

* Semnificativ în comparație cu lotul Control, la $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Tabelul 11. Parametrii imunologici și de coagulare la Control și la grupurile experimentale expuse la Hr și produșii de derivatizare ai acestora. Valorile sunt exprimate medie \pm SEM (Toma și colab., 2018).

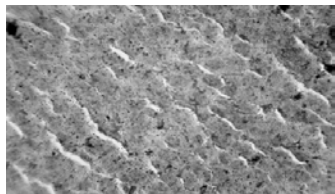
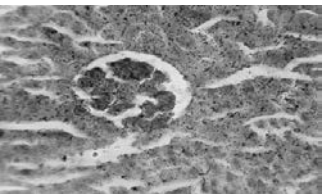
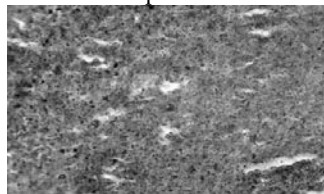
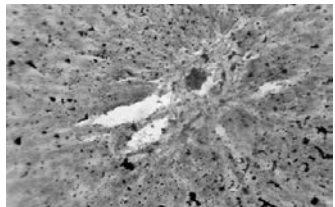
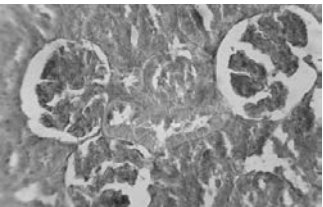
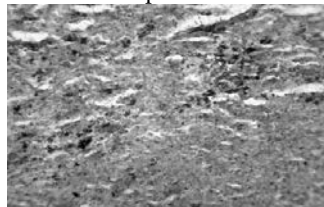
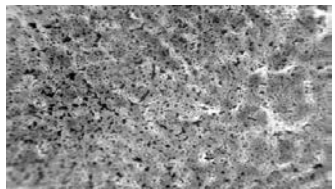

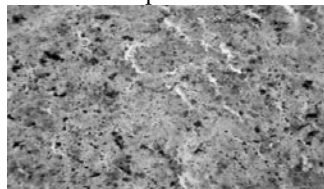
	Control	nHr	pHr	HrHSA	HrRbr
IgA (mg/dL)	2.4 ± 0.5	$6.4 \pm 0.2^{***}$	$5 \pm 0.6^{***}$	$4.2 \pm 0.2^{***}$	2.2 ± 0.2
IgG (mg/dL)	140 ± 1.2	$217.2 \pm 12.6^{***}$	$199.5 \pm 22.8^{***}$	$233.3 \pm 4.2^{***}$	143.5 ± 2.6
IgM (mg/dL)	6.5 ± 0.7	$22.8 \pm 0.8^{***}$	$19 \pm 2.5^{***}$	$14.4 \pm 1.6^{***}$	$25.5 \pm 1.5^{***}$
C3C (mg/dL)	54 ± 3.3	$81.8 \pm 5.4^{**}$	45.7 ± 2.2	$137.1 \pm 9.6^{***}$	42.8 ± 15
CRP (mg/dL)	1.7 ± 0.2	$3.2 \pm 0.3^{***}$	$3.1 \pm 0.3^{***}$	$3.1 \pm 0.3^{**}$	1.5 ± 0.2
Fibrinogen (mg/dL)	42 ± 1.07	$315.6 \pm 11.2^{***}$	$266.9 \pm 5.4^{***}$	$203.7 \pm 4^{***}$	$197.2 \pm 10^{***}$
PT (s)	10.6 ± 0.3	10.5 ± 0.3	$9.6 \pm 0.4^{**}$	10.2 ± 0.1	10.2 ± 0.2
aPTT (s)	15.7 ± 0.2	15.7 ± 0.3	15.5 ± 0.1	15.6 ± 0.2	16.1 ± 0.3

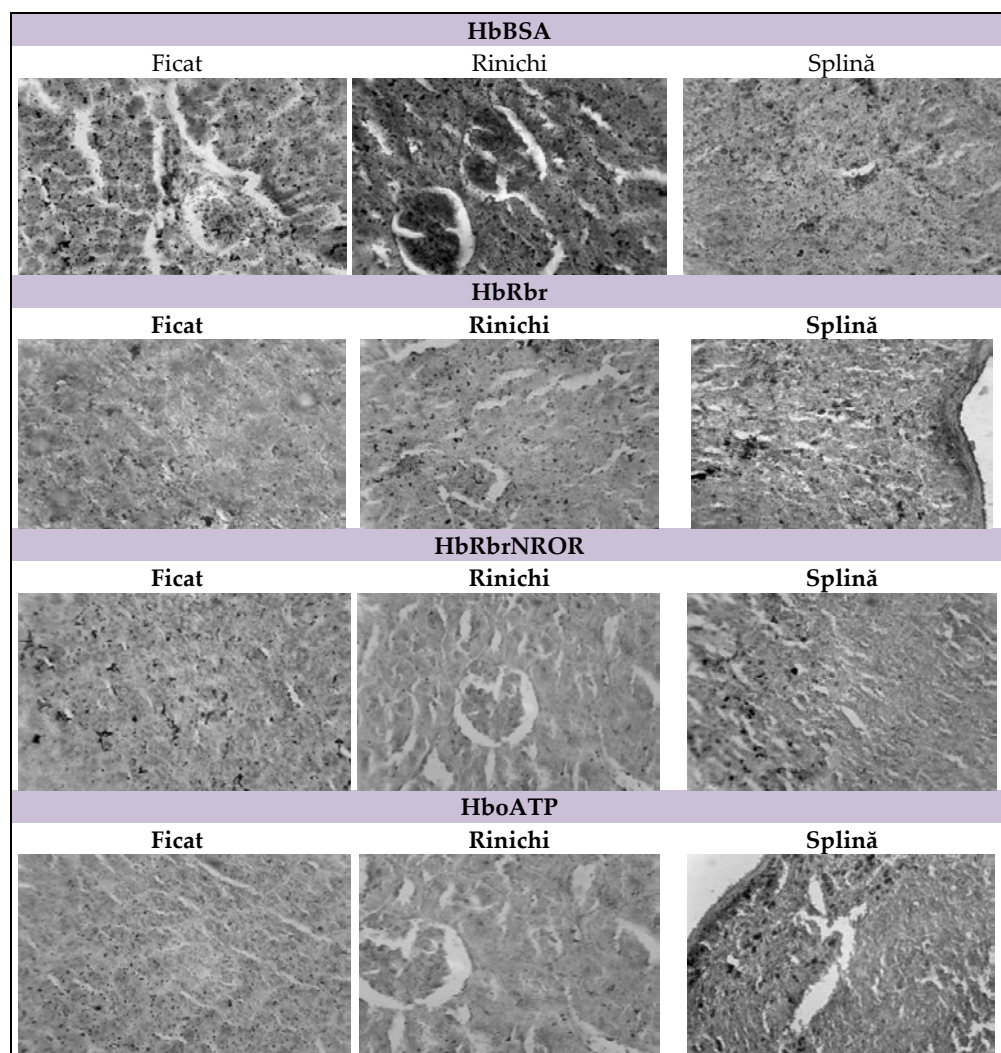
* Semnificativ în comparație cu lotul Control, la $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Alături de determinări hematologice, imunologice, coagulometrice și de stres oxidativ, s-au efectuat o serie de analize histochimice asupra ficatului, splinei și rinichiului. Analiza s-a bazat pe metoda Pearls, având în vedere implicațiile Hb respectiv Hr în metabolismul fierului. Prezența depozitelor de feritină, mai mari decât la loturile Control, denotă reacții

tisulare de chelatare a fierului, micro/macro hemoragii sau depozitarea acestuia în condițiile în care organismul îl sesizează liber și în exces. Fierul liber, în contextul nostru experimental, indică fragmentarea proteinelor și eliberarea centrilor metalici cu fier. **Tabelul 12** sumarizează aspectele microscopice ale ficatului, splinei și rinichiului, supuse colorației Pearls (pentru depistarea depozitelor de fier) la Control și loturile tratate cu Hb și derivați ai Hb obținuți prin derivatizare. Evaluarea semicantitativă a reacției Pearls s-a realizat pe o scală a intensității reacției cuprinsă între - (reacție negativă), + (aspect normal) și ++++ (reacție foarte intensă, depozite de fier abundente) (Toma și colab., 2016).

Tabelul 12. Evaluarea histochimică a depozitelor de feritină la Control și la grupurile experimentale expuse la Hb și derivați ai acesteia. Colorație Pearls, x200 (Toma și colab., 2016).

Control		
Ficat	Rinichi	Splină
		
nHb		
Ficat	Rinichi	Splină
		
HbGL		
Ficat	Rinichi	Splină
		



Tabelul 13 sintetizează intensitatea reacțiilor Pearls la Control și la grupurile experimentale, expuse la Hb, la produșii de derivatizare testați (Toma și colab., 2016).

Tabelul 13. Evaluarea semicantitativă a reacției Pearls la Control și grupurile experimentale, pentru ficat, splină și rinichi.

	Control	nHb	HbGL	HbBSA	HbRbr	HbRbrNROR	HboATP
Ficat	+	++	++++	+++	-	+	+
Splină	++	+	++++	++	+	+	+
Rinichi	+	-	+	++++	+	-	-

În **Fig. 8** sunt prezentate rezultatele analizei histochemice pentru depistarea feritinei, la loturile expuse hemeritrinei și derivaților acesteia, în comparație cu grupul Control. De asemenea, evaluarea semicantitativă a reacției Pearls s-a realizat pe o scală a intensității reacției cuprinsă între - (reacție negativă), + (aspect normal) și ++++ (reacție foarte intensă, depozite de fier abundente). Rezultatele evaluării sunt prezentate în **Tabelul 14** (Toma și colab., 2018).

Tabelul 14. Evaluarea semicantitativă a reacției Pearls la Control și grupurile experimentale tratate cu Hr și derivați ai acesteia.

	Control	nHr	pHr	HrHSA	HrRbr
Ficat	-	-	-	+	-
Splină	+	+++	+++	++	+++
Rinichi	-	+/-	+/-	+/-	-

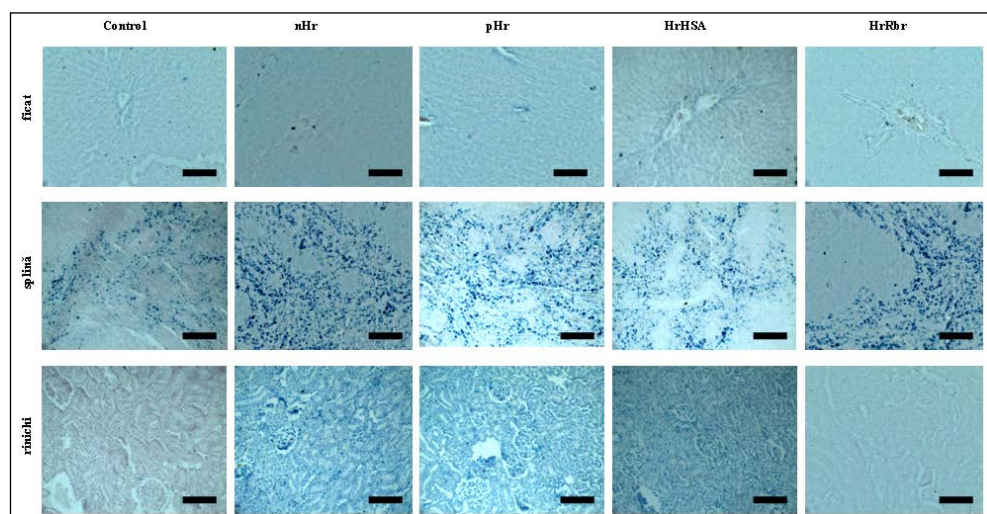


Fig. 8. Evaluarea histochemică a depozitelor de feritină la Control și la grupurile experimentale expuse la Hr și derivați ai acesteia. Colorație Pearls, x200. Scala = 50 μ m.

4.6. Discuții

Adesea, cercetările cu privire la molecule, pe bază de Hb sau – mai nou – Hr, s-au axat pe caracterizarea unui singur produs de derivatizare

sau asupra formelor native ale acestor proteine (Katz și colab., 2002; Standl și colab., 2003). Formele native, alături de cele rezultate în urma derivatizării, constituie o serie nouă de substitute sangvine care au fost testate *in vivo*, în vederea selectării celor mai performante molecule. „Performanța” se referă la buna capacitate de a transporta gazele respiratorii, absența extravazării endoteliale, caracter imunogen scăzut și un comportament redox, ușor de tamponat, prin mecanisme endogene (enzimatice și nonenzimatice). Rezultatele administrării *in vivo* a Hb și a derivaților acesteia cuprind evaluarea redox (**Tabelul 4**, **Tabelul 6**), hematologică (**Tabelul 8**), imunologică și de coagulare (**Tabelul 9**), și evaluarea histochimică (**Tabelul 12**, **Tabelul 13**). După 48h de la administrarea diferitelor forme derivatizate ale Hb, nivelurile CAT și TBARS, nu au prezentat variații semnificative la lotul nHb. Hb nativă (nHb), după cum au arătat studiile *in vitro*, are un puternic caracter prooxidant, neconfirmat însă de datele noastre experimentale *in vivo*. Nivelurile crescute ale TBARS în ser au fost, în general, asociate cu nivelurile crescute ale activității CAT serice, iar datele noastre (Toma și colab., 2016) au confirmat acest fapt, precum și Fernandes și colab. (2014) au menționat. Alături de activitatea CAT și concentrația TBARS, parametrii echilibrului acido-bazic determinați (pH, presiunile parțiale ale gazelor respiratorii, rezerva alcalină și indicatorii derivați) au prezentat ușoare variații înspre alcalinizare. Creșterea presiunii parțiale a oxigenului și scăderea presiunii parțiale a CO₂ au indicat o interacțiune bună, în termeni de eficiență și performanță, între moleculele pe bază de Hb testate și gazele respiratorii. Variațiile concentrației bicarbonatului nu au fost semnificative, cu toate că s-a remarcat tendința de creștere a CHCO_3^- la loturile HbRbr, HbRbrNROR și HboATP, care, pot fi asociate cu o predispunere spre alcaloza metabolică. Aceste observații au fost susținute de nivelurile excesului de baze din fluide extracelulare (BE-ecf) și a celui de baze cu proprietăți tampon (BE-b). Spre deosebire de studii similare, care au menționat scăderea concentrației de baze în urma administrării

substitutelor sangvine pe bază de Hb (Gulati și colab., 1998; Standl și colab., 2003), datele noastre au demonstrat un efect minim al moleculelor testate asupra echilibrului acido-bazic. Acest fapt a adus un avantaj major pentru derivații de Hb testați, în raport cu ceea ce se utilizează în prezent (Toma și colab., 2016).

Un obiectiv important al cercetărilor, în domeniul substitutelor sangvine, a fost obținerea unor variante moleculare cu caracter imunogen minim. Sub acest aspect, parametrii hematologici determinați la Control și grupurile expuse la Hb și produșii acesteia, de derivatizare, au prezentat variații semnificative la toate loturile. Totuși, valorile parametrilor liniei eritrocitare au prezentat variații foarte scăzute. RBC, HGB și HCT au avut tendința de a ieși din intervalele de referință, însă restul markerilor eritrocitari, prezenți în hemogramele prezentate în Tabelul 8, nu au fost modificați semnificativ (Toma și colab., 2016). Eritrocitoza observată este întâlnită în situații acute, precum deshidratarea dar și în circumstanțe cronice, care includ hipoxemie, insuficiență renală și alte condiții care determină creșterea sintezei de eritropoietină. În coordonatele noastre experimentale, sunt excluse condițiile cronice de creștere a numărului de eritrocite, inclusiv hipoxemia, de care toate loturile experimentale au fost susceptibile. După cum au arătat datele experimentale, presiunea parțială a oxigenului a fost crescută la toate loturile expuse substitutelor sangvine, fapt care a exclus hipoxemia ca factor generator al eritrocitozei, deshidratarea fiind cauza cea mai probabilă, după cum au arătat și markerii imunocoagulometrici determinați (Toma și colab., 2016).

Toate moleculele derivate din Hb au indus un răspuns inflamator sistemic, sugerat de creșterea de două ori a concentrației fibrinogenului și de patru ori, a concentrației proteinei C reactive, acestea fiind asociate și cu o trombocitoză proeminentă. Ambele proteine de fază acută sunt produse în ficat, în urma stimulării acestuia de către IL-6, sintetizată cu prevalență de către macrofagele activate. De regulă, IL-6 este controlată prin producția de IL-1, responsabilă de apariția reacției febrile și de

creșterea producției și eliberării granulocitelor (Latimer, 2011). Totuși, granulocitoza a fost observată doar la lotul HbRbrNROR, valoarea nefiind în afara intervalului de referință. De ce derivații Hb nu au putut să determine o reacție granulocitară semnificativă, care să se suprapună cu reacția inflamatorie sistemică, este o întrebare la care încă nu avem un răspuns. Moleculele testate au stimulat imunitatea mediată umoral, fapt susținut de absența creșterii semnificative a limfocitelor (s-a observat scăderea acestora) și de creșterea imunoglobulinelor la toate grupurile experimentale (Toma și colab., 2016). Scăderea limfocitelor nu a fost pusă pe seama imunosupresiei celulare, ci mai degrabă a fost rezultatul unor solicitări intense, fără reducerea producției limfocitare, după cum Latimer (2011) a descris o serie de cazuri clinice, similare sub aspectul hemogramei. Este important să menționăm că, adiția BSA și a Rbr/NROR la HbGL, nu a fost percepută de către modelul experimental, ca o procedură a cărei rezultată este amplificarea imunogenității polimerului HbGL. HbGL s-a dovedit a fi slab imunogenă și în alte modele experimentale cu care a fost testată, inclusiv cele umane. Adiția unor proteine peste polimerul HbGL a condus la obținerea unor copolimeri cu performanțe superioare HbGL și cu imunogenitate nemodificată, comparabilă cu datele altor autori (Gould și colab., 1998; Jahr și colab., 2008). Moleculele derivate din Hb modulează răspunsul imun prin activarea semnalizării trombocitelor, situate la intersecția dintre reacția imună și hemostază, concluzie susținută de valorile crescute ale PLT, fibrinogen, PT și aPTT și de cercetări similare, precum cele ale lui von Hundelshausen și Weber (2007), Arnaud și colab. (2012) și Yeaman (2014).

În cele din urmă, s-a determinat gradul de captare și depozitare a fierului (Corația Pearls), în raport direct proporțional cu instabilitatea moleculei testate (Toma și colab., 2016). Datele histochemice au arătat grade diferite de acumulare a fierului sub formă de feritină. Cele mai importante depozite de fier s-au regăsit în ficat la loturile: nHb, HbGL, HbBSA; în splină la loturile: nHb, HbGL, HbBSA; în rinichi, la loturile:

HbBSA și HbGL. Interesant a fost faptul că HbRbrNROR și HbRbr s-au distins, de restul moleculelor, prin cantitatea foarte scăzută de feritină pe care au determinat-o la nivelul țesuturilor analizate (Toma și colab., 2016). Acest comportament biochimic poate fi interpretat prin cheia protecției redox, pe care Rbr o oferă copolimerului. Astfel, scindarea acestuia, urmată de eliberarea fierului și creșterea depozitelor feritice, a fost semnificativ redusă, iar acest mecanism este susținut și de rezultatele lui Baek și colab. (2012).

În privința derivaților Hr, evaluarea hematologică, imunocoagulometrică, redox și histochimică s-a realizat în raport cu ceea ce s-a observat la setul de molecule derivate din Hb. Hemeritina nativă (nHr) a fost comparată cu trei forme polimerice ale Hr și anume HrGL, HrHSA, respectiv HrRbr. Cuplarea Hr cu HSA a avut obiectivul captării de către HSA a radicalilor liberi (funcție de *free-radical quencher*). Cuplarea Hr cu Rbr s-a bazat pe proprietatea peroxidazică a Rbr și, astfel, a avut obiectivul protejării Hr, de acțiunea speciilor reactive ale oxigenului (cu prevalență peroxidul) generate în urma autooxidării Hr, strategie dezvoltată și testată experimental în cercetările noastre anterioare (Toma și colab., 2016). Administrarea *in vivo*, a Hr și a setului de molecule derivatizate din aceasta, a produs un dezechilibru redox moderat (Tabelul 5) la loturile HrRbr (CAT, $p < 0.05$) și HrHSA (TBARS, $p < 0.05$). Celelalte grupuri nu au prezentat variații semnificative statistic, activitatea prooxidantă scăzută fiind comparabilă cu cea determinată la setul de molecule pe bază de Hb (Toma și colab., 2016). În plus, la lotul HrHSA s-a înregistrat o presiune parțială a oxigenului de 42.5 ± 1 mmHg, în timp ce la testele cu Hb și derivați, pO_2 maximă înregistrată a fost de 47.1 ± 1 mmHg la lotul HbBSA, ceea ce, sub acest aspect, poziționează HbBSA deasupra tuturor moleculelor derivatizate din Hb/Hr (Toma și colab., 2016; Toma și colab., 2018).

Markerii imuno-hematologici (Tabelul 10 și Tabelul 11) au indicat o toleranță imunologică sistemică. Modificările hemogramei și ale

markerilor imunocoagulometrici observate la setul de molecule pe bază de Hb s-au identificat, cu aceleași tendințe, și în cazul testelor *in vivo* cu Hr și produși de derivatizare ai acesteia. La lotul nHr, numărul WBC a fost dublu față de Control, în timp ce restul moleculelor co-polimerizate au indus variații cu cca. +/- 20%. La lotul HrHSA, s-a înregistrat o scădere, iar la HrGL și HrRbr s-a observat creșterea WBC, ceea ce a sugerat că prin derivatizare se poate controla răspunsul imun celular. Pentru CRP s-a înregistrat o creștere de două ori, iar pentru fibrinogen, o creștere de cinci ori a concentrației plasmatice, comparativ cu lotul Control, ceea ce denotă existența unui sindrom inflamator sistemic, astfel, Complementul C3 și fibrinogenul au urmat același trend de creștere ($p < 0.01$). Ca și la testele *in vivo* pentru Hb, nici în cazul Hr testată *in vivo*, sindromul inflamator sistemic al modelului experimental nu a avut răsunet în leucogramă, ceea ce denotă tolerabilitatea acestui set de molecule candidate pentru substitute sangvine. Limfocitele nu au prezentat variații, însă imunoglobulinele au marcat o creștere substanțială în raport cu lotul Control ($p < 0.001$). Acest fapt a sugerat că și în cazul setului Hr, ca și în cazul setului Hb, reacția imună a fost de tip umoral, iar în ambele situații, supraviețuirea nu a fost afectată (Toma și colab., 2018).

După cum s-a arătat în cazul setului de molecule derivate din Hb, depozitele de fier se formează, cu predilecție, în organe bine perfuzate sangvin și cu metabolism intens, precum ficatul, splina și rinichii. Datele histochemice nu au demonstrat depozite de feritină mai mari la loturile experimentale, decât la grupul Control (**Fig. 8, Tabelul 14**).

4.7. Concluzii

Cercetările noastre au cuprins testarea *in vivo* a mai multor molecule derivate din Hb și Hr, folosind ca biosistem model, șobolanul alb din rasa Wistar. Moleculele testate au fost concepute ca potențiale substitute sangvine, iar cercetările prezentate în această lucrare, reprezentând etapa de

screening imunologic și redox. S-a observat reactivitatea prooxidantă diferită între moleculele testate, iar ipoteza conform căreia, moleculele mai puțin prooxidante au efecte fiziopatologice negative mai scăzute, a fost confirmată. În cazul setului de molecule pe bază de Hb, HbGL a fost considerată molecula de referință, diferite condiționări ale acesteia fiind deja testate pe subiecți umani în Africa de Sud (Toma și colab., 2016). Totuși, și în testele pe oameni, reactivitatea prooxidantă a HbGL a determinat, adesea, sistarea cercetărilor. Adăugarea unor proteine la Hb, precum Rbr și NROR, a condus la stimularea imunității umorale de către copolimerii HbRbr respectiv HbRbrNROR. Performanțele observate sub aspectul transportului de gaze respiratorii și a toxicității tisulare (depozitele de feritină) încadrează aceste molecule ca fiind mai eficiente decât referința HbGL, trecând peste „costul” imunologic, situație întâlnită, de asemenea, și în cazul HbBSA. În privința transportorilor de oxigen pe bază de Hr, datele experimentale au arătat un comportament *in vivo* similar cu cel observat în cazul studiilor cu Hb și derivați. Reactivitatea redox *in vivo* a fost mai scăzută decât în cazul Hb, însă reacția imună a fost mai proeminentă în cazul Hr și derivaților acesteia (Toma și colab., 2016; Toma și colab., 2018).

Folosirea *in vivo* unor proteine prooxidante, alături de diverse molecule rezultate prin derivatizarea Hb sau Hr, a evidențiat: (i) reacția imună exclusiv umorală, apărută în urma expunerii la derivați ai Hb respectiv Hr; (ii) intersecția imunității umorale cu hemostaza via trombocite, fibrinogen și imunoglobuline, atunci când biosistemul identifică proteine specifice sângelui; (iii) modularea reactivității prooxidante a derivaților de Hb/Hr a condus la modularea efectelor fiziopatologice ale acestora; (iv) între stresul oxidativ și răspunsul inflamator sistemic există o relație de directă proporționalitate.

5.

Statusul oxidativ și bioactivități ale curcuminei asupra sistemului nervos și ale alicinei asupra sistemului imunitar la șobolanul alb din rasa Wistar

5.1. Design experimental

Cercetările au cuprins două experimente distincte, ambele fundamentate pe elemente ale stresului oxidativ. Curcumina a fost evaluată sub aspectul efectului neuromodulator, în contextul inducerii cu diazepam a dezechilibrului redox, anxietății și tulburărilor de memorie. Alicina a fost studiată în condiții normale, markerii stresului oxidativ având variații fiziologice. **Tabelul 15** sintetizează grupurile experimentale, tratamentele aplicate, durata de desfășurare și tipul de probe, respectiv de determinări efectuate. Evaluarea bioactivității alicinei s-a fundamentat pe o idee anterior confirmată în studiile cu Hb și Hr. Conform acesteia, între reacția inflamatorie sistemică și stresul oxidativ există o relație de directă proporționalitate. Ne-am propus să izolăm doar stresul oxidativ din sindromul inflamator sistemic și apoi să acționăm cu molecule antioxidante precum alicina, în vederea stabilirii corelațiilor dintre statusul redox și reacția imună.

Tabelul 15. Designul experimental al testării curcuminei și alicinei în condiții de stres oxidativ indus cu diazepam la nivelul sistemului nervos și în condiții normale

	Model indus	Loturi exp.	Durată exp.	Tip de probe	Determinări
Curcumină (CUR) 150 mg/kg corp/zi, oral	stres oxidativ indus cu diazepam, 2 mg/kg corp i.p. doză unică	Control CUR + CMC DZP + CMC DZP + CUR + CMC	4 săptămâni tratament cu curcumină	creier (frontal, hipocamp)	NF- κ B pNF- κ B ERK ½ iNOS
Alicină (ALI)	Status redox normal	<i>In vivo</i> (adm. orală): Control Alicină (ALI): doza 1: 1.25 mg/kg doza 2: 2.5 mg/kg doza 3: 5 mg/kg	2 săptămâni	sânge integral	WBC, LYM, MON, NEU, LYM%, MON%, NEU%, CAT, SOD, GSH, TP, ALB, IgA, IgG, IgM
					molecular docking
		<i>In vitro</i> : Control Alicină (ALI): doza1: 10 µg/mL doza 2: 30 µg/mL doza 3: 60 µg/mL doza 1 + GSH 1mM doza 2 + GSH 1mM doza 3 + GSH 1mM	24 ore	supernatant celule	CAT, SOD, TP, IgA, IgG, IgM
					molecular docking

Legendă: DZP – diazepam; CUR – curcumină; CMC – carboximetilceluloză; NF- κ B – nuclear factor κ B; pNF- κ B – nuclear factor κ B fosforilat; ERK ½ – extracellular signal-regulated kinase; iNOS – NO sintaza inductibilă; WBC – white blood cells; LYM – limfocite; MON – monocite; NEU – neutrofile; LYM/MON/NEU % – limfocite %, monocite %, neutrofile %; CAT – catalază; SOD – superoxid dismutază; GSH – glutation redus; TP – proteine totale; ALB – albumină; IgA/G/M – imunoglobulina A/G/M.

Ambii compuși de origine vegetală au fost testați *in vivo*, pe șobolani albi din rasa Wistar, masculi în cazul curcuminei și femele în cazul alicinei, în vârstă de 4 luni, cu greutatea de 230 ± 20 g. Loturile experimentale au cuprins 10 animale/lot. Cercetările s-au derulat în acord cu Directiva 2010/63/EU și cu Acordul Comisei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” (pentru experimentul cu curcumină), respectiv al USAMV Cluj-Napoca (pentru experimentul cu alicină). Animalele au fost menținute în condiții zooigienice corespunzătoare, ritm lumină/întuneric 12h/12h, cu acces liber la peletul normocaloric și apă. Recoltarea probelor s-a făcut în urma neuroleptanalgeziei cu un mix de

ketamină-xilazină (90 mg/kg corp ketamină + 10 mg/kg corp xilazină) (Sevastre-Berghian și colab., 2017).

5.2. Protocoale experimentale

5.2.1. *Metode spectrofotometrice*

Metodele spectrofotometrice au fost folosite pentru determinarea activității catalazei, pentru cuantificarea proteinelor totale, albuminei și glutatationului. Tehnicile folosite au fost reprezentate de spectroscopia UV-vis, cu ajutorul căreia se corelează o reacție de culoare apărută în urma unei reacții specifice (relație direct proporțională) sau stingerea semnalului unei anumite molecule (relație invers proporțională), cu concentrația moleculei de interes/de dozat (Toma și colab., 2019).

5.2.2. *Analiza hematologică în flux*

Sângele recoltat pe EDTAK₂ 4% (sarea dipotasică a acidului etilendiaminotetraacetic), 50 μL/tub recoltare, desicat în prealabil, a fost supus analizei hematologice, folosind un analizor automat de tip Abaccus Diatron. Acesta emite un fascicul laser prin dreptul căruia trece fluxul de probă (sânge integral) împreună cu reactivul specific de diluție și liză. Astfel, s-au măsurat diametre celulare, s-a cuantificat numărul de celule și s-a determinat concentrația hemoglobinei sangvine. Aparatul a calculat, astfel, indicii leucocitari: WBC, LYM, MON, NEU, LYM%, MON%, NEU% (Toma și colab., 2019).

5.2.3. *Metode turbidimetrice*

Metodele turbidimetrice au fost aplicate în vederea determinării concentrației imunoglobulinelor (A, G, M). Cuantificarea fracțiunilor imunoglobulinelor (IgA, IgG, IgM) se bazează pe reacția antigen-anticorp,

în urma căreia, apare o turbiditate direct proporțională cu mg/dL imunoglobulină (Toma și colab., 2019).

5.2.4. *Western blot*

Metoda a fost aplicată în studiul bioactivității curcuminei. Nivelul NF- κ B, pNF- κ B și iNOS s-a determinat prin Western blot iar pentru iNOS, determinarea a fost completată de analiza imunohistochimică. Lizatele cerebrale (20 μ g proteină/bandă) au fost separate prin electroforeză în gel SDS PAGE 8%, apoi au fost transferate pe membrane de polivinilidenfluorură (BioRad). Bloturile au fost apoi blocate și incubate cu anticorpi NF- κ B, pNF- κ B și iNOS (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germania) diluați 1:500. După spălare, bloturile au fost incubate cu anticorpii secundar corespunzător cuplat cu HRP, diluție 1:500 (Santa Cruz Biotechnology). Proteinele au fost vizualizate și detectate folosind un substrat de tipul *Supersignal West Femto Chemiluminiscent* împreună cu un sistem de vizualizare a gelului. Proteina de control a fost GAPDH. Nivelul ERK 1/2 a fost evaluat prin Path Scan Sandwich ELISA, în conformitate cu protocolul furnizat de producător (Cell Signaling Inc., Danvers, MA, SUA). Rezultatele au fost exprimate ca unități de densitate optică/mg de proteine (Sevastre-Berghian și colab., 2017).

5.2.5. *Metode histologice și imunohistochimice*

Pentru analiza histologică și imunohistochimică, probele de creier au fost fixate în formaldehidă neutră 10 % timp de 3 zile. După fixare, țesutul a fost histoprocesat și inclus în parafină. Din blocurile de parafină obținute s-au efectuat secțiuni groase de 5 μ m, care au fost, apoi, supuse colorației hematoxină-eozină, respectiv imunocolorației pentru iNOS. Imunohistochimia a fost efectuată pe probe fixate în paraformaldehidă 4 % soluție în PBS 0.1M, pH 7.4. Detectarea distribuției și a gradului de exprimare a iNOS s-au efectuat folosind un kit Dako ABC-HRP-Biotină.

Anticorpul primar anti-iNOS a fost diluat 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), iar vizualizarea imunoreacției s-a realizat cu DAB (diaminobenzidină). Zonele cerebrale investigate au fost aria CA3 hipocampică și cortexul frontal, folosind un microscop Optika B-383LD2 (Sevastre-Berghian și colab., 2017).

5.2.6. Metode pentru testarea *in vitro* a alicinei pe limfocite B CD19+

Celule mononucleare, din sângele periferic (PBMC) uman, au fost izolate din sânge proaspăt recoltat. Izolarea PBMC s-a realizat în gradient de separare. Sângele a fost recoltat în tuburi heparinizate, amestecat în raport 1:1 cu PBS și trecut apoi printr-un filtru de tip Histopaque 1.077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). După centrifugarea la 2000 rpm, stratul de limfocite, format între plasmă și stratul Histopaque, a fost izolat prin aspirare; celulele au fost spălate cu tampon de separare cu 0.5% ser fetal bovin în PBS. Populațiile integrale au fost apoi supuse separării magnetice. Limfocitele au fost numărate folosind camera Bürker și apoi separate, folosind microsfere anti-CD19 (kit furnizat de Milteny Biotec, Bergish Gladbach, Germania) după cum a fost descris de Schrepler și colab. (2015). Suspensia cu PBMC, conținând 107 celule/mL, a fost incubată cu microsfere etichetate cu anticorp anti-CD19. S-a obținut, astfel, o suspensie celulară îmbogățită cu limfocite B CD19+. Concentrația finală a celulelor B CD19+, în mediul de cultură, a fost de 25.000 celule/godeu (placă de 96 de godeuri). Cu limfocitele B CD19+ astfel pregătite, s-au efectuat studii privind acțiunea a trei doze diferite de alicină și de alicină + GSH. Concentrațiile de lucru ale alicinei au fost: doza 1 (A1) = 10 $\mu\text{g/mL}$; doza 2 (A2) = 30 $\mu\text{g/mL}$; doza 3 (A3) = 60 $\mu\text{g/mL}$. Concentrația GSH adăugat mediului de cultură a fost de 1 mM. Tratamentul limfocitelor B CD19+ cu alicină + GSH s-a efectuat cu următoarele concentrații: GA1 = GSH 1 mM + alicină 10 $\mu\text{g/mL}$; GA2 = GSH 1mM + alicină 30 $\mu\text{g/mL}$; GA3 = GSH 1 mM + alicină 60 $\mu\text{g/mL}$. Dozele au fost stabilite în concordanță cu

studii similare (Reagan-Shaw și colab., 2008; Sharma și MnNeill, 2009). După 24 de ore, supernatantul a fost izolat în vederea determinării concentrației imunoglobulinelor și a proteinelor totale. Celulele rămase au fost supuse lizei, lizatul centrifugat la 14.000 r.p.m., iar din supernatantul rezultat, s-au determinat activitățile CAT și SOD (Toma și colab., 2019).

5.2.7. Metode de simulare moleculară pe receptori de tip scavenger

În studiile noastre privind relația dintre stresul oxidativ și reacția imună și mecanismul prin care alicina, ca antioxidant, stimulează imunitatea umorală, am derulat și cercetări *in silico*, de simulare moleculară. Alicina cu GSH, după cum a fost menționat în *Fundamentarea teoretică* (pag. 20-26) formează S-alilmercaptoglutation (SAMG), față de care a existat presupunerea că interacționează cu o seamă de receptori de tip *scavenger* (Colec12, MARCO, SCAR B1). Pentru verificarea ipotezei, s-a folosit programul Autodock Vina (versiunea 4, Molecular Graphics Laboratory, CA, USA) care funcționează pe baza unui algoritm genetic Lamarckian. Astfel, s-au testat multiple posibilități de interacțiune, cele cu probabilitatea cea mai mare fiind de ordin geometric (Toma și colab., 2019).

5.2.8. Analiză statistică

Toate analizele statistice au fost efectuate folosind software-ul GraphPad Prism, versiunea 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Rezultatele au fost exprimate ca medie \pm deviația standard a mediei (SD). Datele au fost supuse ANOVA, urmată de testul Bonferroni. Valoarea lui *p* asociat testului post-hoc Bonferroni, mai mică de 0.05, a fost considerată semnificativă statistic. Coeficienții de corelație au fost interpretați după scala Colton. Analiza multivariată a datelor obținute, s-a realizat prin PCA

(Principal Component Analysis), folosind softul Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Toma și colab., 2019).

5.3. Rolul curcuminei, în modularea reacției antioxidative *via* ERK $\frac{1}{2}$ – NF-kB în hipocamp și lobul frontal, după terapia cu diazepam

Efectul curcuminei asupra exprimării NF-k β , pNF-k β și iNOS din creier este ilustrat în **Fig. 9**. Administrate individual, curcumina și diazepamul au crescut semnificativ exprimarea NF-k β și pNF-k β (forma activă a NF-k β) comparativ cu lotul Control, în hipocamp și lobul frontal ($p < 0.001$), după cum s-a cuantificat prin Western blot. Administrarea diazepamului împreună cu curcumina (DZP+CUR+CMC) a scăzut exprimarea NF-k β , în raport cu nivelul acestuia la lotul DZP+CMC ($p < 0.001$). Exprimarea pNF-k β a fost scăzută, atât în urma tratamentului cu diazepam, cât și în urma tratamentului cu curcumină, dar fără semnificație statistică ($p > 0.05$). În lobul frontal, s-a înregistrat o creștere a NF-k β ($p < 0.01$) și a pNF-k β ($p < 0.001$), după administrarea curcuminei și a diazepamului (**Fig. 9b** și **Fig. 9c**). În cazul acțiunii curcuminei, respectiv a diazepamului, asupra exprimării iNOS, prin Western blot (**Fig. 9a**), s-a observat că diazepamul a crescut semnificativ iNOS în hipocamp, în raport cu Controlul și curcumina ($p < 0.001$), iar în lobul frontal, creșterea exprimării iNOS a avut semnificație statistică doar în raport cu lotul tratat cu curcumină ($p < 0.001$) (**Fig. 9d**). Influența curcuminei asupra ERK $\frac{1}{2}$ (**Fig. 10**) s-a manifestat, prin scăderea semnificativă a exprimării acestuia, comparativ cu lotul Control. Diazepamul a crescut, însă, exprimarea ERK $\frac{1}{2}$ ($p < 0.001$). Administrarea împreună a diazepamului și a curcuminei (lotul DZP+CUR+CMC) a scăzut nivelul de exprimare a ERK $\frac{1}{2}$ în hipocamp, comparativ cu lotul DZP, spre deosebire de lobul frontal, unde tratamentul cu diazepam și curcumină a stimulat activarea ERK $\frac{1}{2}$ (Sevastre-Berghian și colab., 2017).

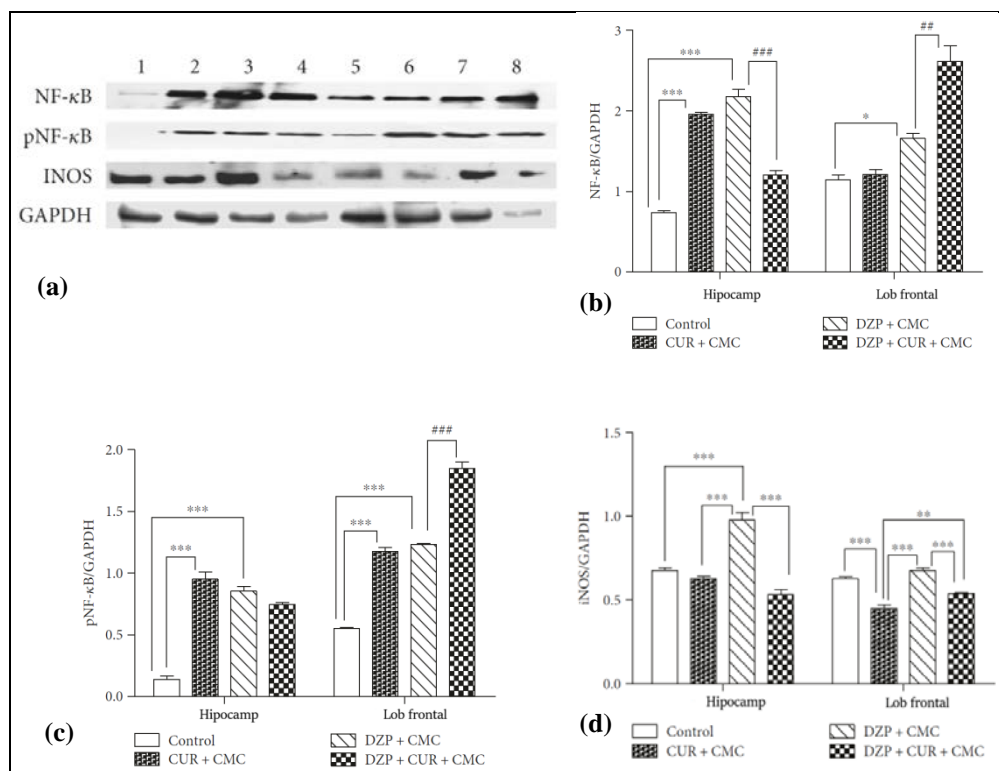


Fig. 9. Efectul administrării curcuminei asupra exprimării NF-κβ, pNF-κβ și iNOS în hipocamp și lobul frontal. Exprimarea NF-κβ, pNF-κβ și iNOS a fost analizată prin Western blot, benzile au fost măsurate prin densitometrie, iar rezultatele au fost normalizate față de GAPDH. (a) Western blot: 1-4 – hipocamp (1: Control, 2: CUR+CMC, 3: DZP+CMC, 4: DZP+CUR+CMC); 5-8 – lob frontal (5: Control, 6: CUR+CMC, 7: DZP+CMC, 8: DZP+CUR+CMC). (b) exprimarea NF-κβ; (c): exprimarea pNF-κβ; (d): exprimarea iNOS. Rezultatele au fost exprimate ca medie ± SEM.

* $p < 0.05$ în raport cu Controlul/CUR+CMC; ** $p < 0.01$ în raport cu Controlul/CUR+CMC; *** $p < 0.001$ în raport cu Controlul/CUR+CMC; # $p < 0.01$ în comparație cu DZP+CMC; ### $p < 0.001$ în comparație cu DZP+CMC.

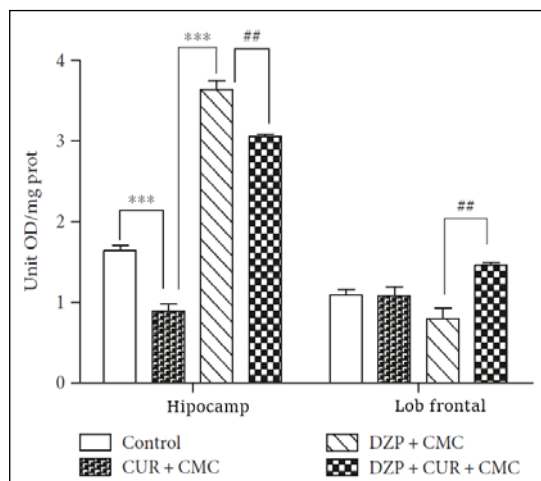


Fig. 10. Efectul curcuminei asupra exprimării ERK $\frac{1}{2}$ în creier (hipocamp și lob frontal). În hipocamp, nivelul ERK $\frac{1}{2}$ a fost semnificativ scăzut la animalele tratate cu curcumină, comparativ cu Controlul ($p < 0.001$). Administrarea diazepamului a crescut semnificativ exprimarea ERK $\frac{1}{2}$ ($p < 0.001$) comparativ cu curcumina. În lobul frontal, co-administrarea diazepamului și a curcuminei a determinat creșterea exprimării ERK $\frac{1}{2}$ ($p < 0.01$). Rezultatele au fost exprimate ca medie \pm SEM. (Sevastre-Berghian și colab., 2017)

$p < 0.01$ în comparație cu DZP+CMC; *** $p < 0.001$ în raport cu Controlul/CUR+CMC.

Asupra exprimării iNOS s-a insistat și din punctul de vedere al distribuției enzimei la nivelul cortexului prefrontal și în aria CA3 hipocampică (**Fig. 11**). Totodată, efectul curcuminei asupra structurii hipocampusului și a cortexului prefrontal a fost, de asemenea, analizat (**Fig. 12**). Secțiunile analizate din punct de vedere histologic (colorația hematoxină – eozină) nu au arătat modificări semnificative. Cortexul prefrontal a prezentat o arhitectură normală, iar morfologia straturilor corticale, respectiv a neuronilor, a fost intactă. Imunohistochimic, exprimarea iNOS în hipocamp și cortexul prefrontal, la animalele tratate cu diazepam, a manifestat o creștere în raport cu lotul Control. Administrarea curcuminei alături de diazepam a scăzut însă exprimarea iNOS în neuronii CA3 și la nivelul cortexului prefrontal comparativ cu lotul DZP.

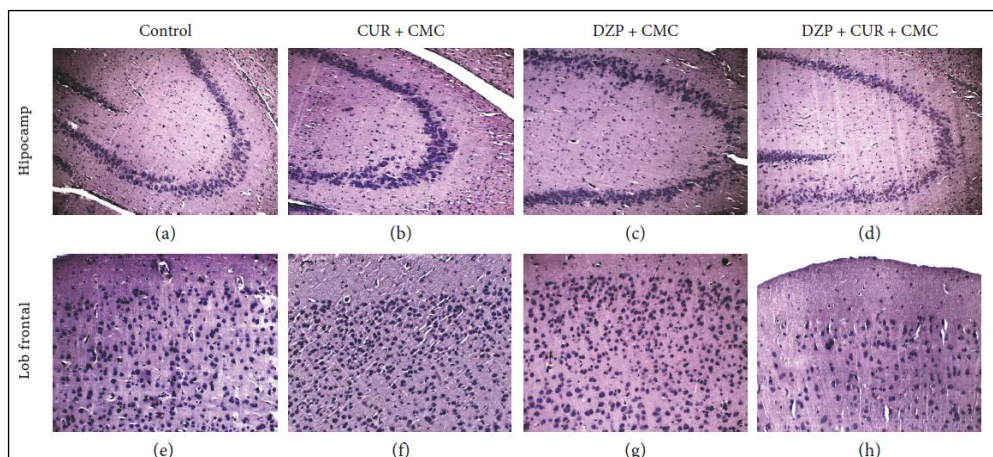


Fig. 11. Aspectul histologic al hipocampusului (a, b, c, d) și al lobului frontal (e, f, g, h), la lotul Control și la grupurile experimentale, în urma tratamentului cu curcumină și diazepam. Tratamentul administrat nu a indus modificări structurale decelabile la nivelul ariei CA3 hipocampice (a-d) sau la nivelul cortexului prefrontal (e-h). x 200, col. HE (Sevastre-Berghian și colab., 2017).

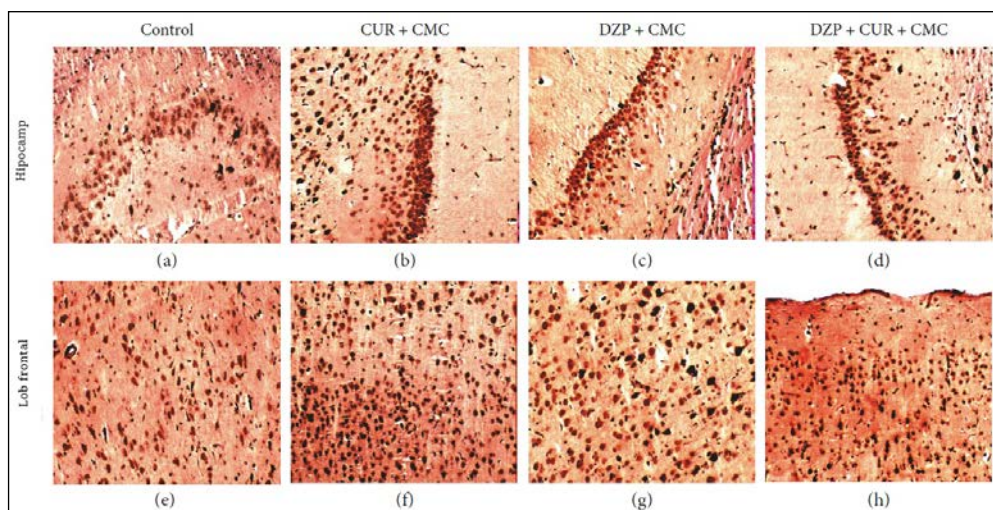


Fig. 12. Evaluarea imunohistochimică a exprimării iNOS în hipocamp (a-d) și în cortexul prefrontal (e-h), la lotul Control și grupurile experimentale. Imunocolorarea a evidențiat scăderea exprimării iNOS în aria CA3 și cortexul prefrontal, la lotul DZP+CUR+CMC, comparativ cu lotul DZP. x 200 (Sevastre-Berghian și colab., 2017).

5.4. Modularea stresului oxidativ și a reacției imune de către alicină

5.4.1. Stresul oxidativ și stimularea reacției imune umorale de către alicină

Administrarea alicinei, în trei doze diferite la șobolanul alb din rasa Wistar, în condiții normale, a scos în evidență efectele acesteia asupra modulării stresului oxidativ în tandem cu stimularea reacției imune umorale. Activitatea CAT și SOD din serul animalelor tratate cu alicină (1.25 mg/kgcorp, 2.5 mg/kgcorp, respectiv 5 mg/kgcorp) a înregistrat o scădere semnificativă ($p < 0.001$ pentru primele două doze și $p < 0.001$ în cazul celei de-a treia doze) (Fig. 13).

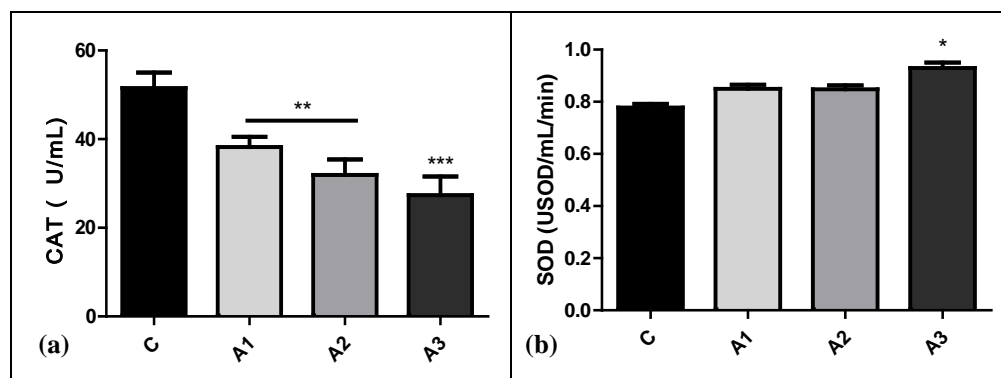


Fig. 13. Activitatea CAT (a) și SOD (b) la lotul Control și la grupurile experimentale. Alicina scade semnificativ activitatea CAT, în timp ce activitatea SOD a avut tendințe de creștere sau crește semnificativ statistic (la doza de 60 mg/kg corp alicină). Valorile sunt exprimate ca medie \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Toma și colab., 2019).

Pe de altă parte, administrarea alicinei a determinat creșterea de cca. două ori a imunoglobulinelor serice (A, G, M) ($p < 0.001$), creșterea moderată a albuminei ($p < 0.05$) și scăderea semnificativă a GSH sangvin ($p < 0.001$) (Fig.14).

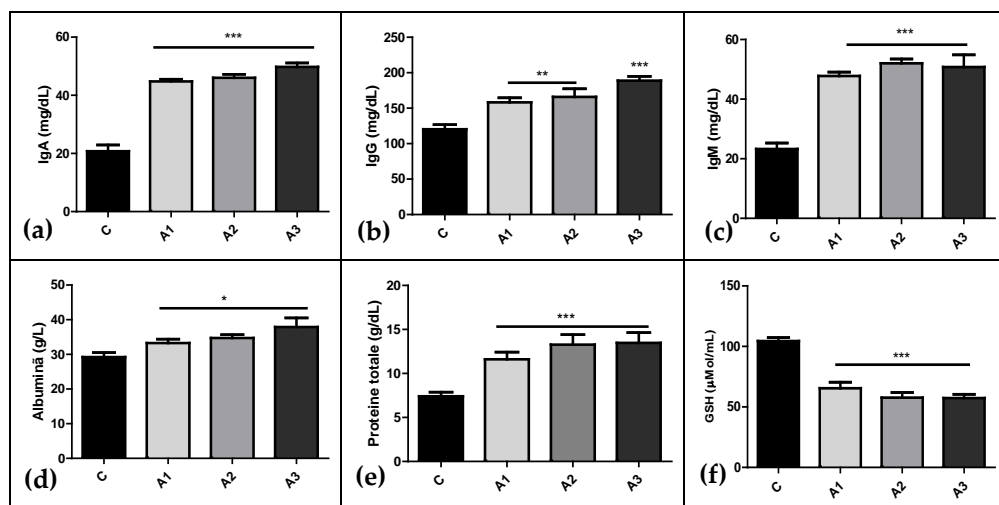


Fig. 14. Concentrațiile serice ale IgA (a), IgG (b), IgM (c), albuminei (d), proteinelor totale (e) și a GSH la lotul Control și la grupurile cărora li s-a administrat alicină. Tratamentul cu alicină a indus creșterea proeminentă a imunoglobulinelor în raport cu Controlul, precum și creșterea concentrației proteinelor serice totale. Albumina a prezentat o creștere ușoară ($p < 0.05$), iar GSH a prezentat o scădere marcantă ($p < 0.001$). Rezultatele au fost exprimate ca medie \pm SD. (Toma și colab., 2019)

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

S-a putut constata, astfel, că pe măsură ce stresul oxidativ este diminuat, producția de imunoglobuline crește, în contextul în care, GSH scade. În plus, creșterea concentrației imunoglobulinelor serice nu a avut ecou în leucogramă, aceasta ne reprezentând variații semnificative statistic (Tabelul 16) (Toma și colab., 2019).

Tabelul 16. Valorile principalilor indicatori leucocitari din hemogramă. Tratamentul cu alicină nu a determinat variații semnificative statistic. Valorile sunt exprimate ca medie \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

	C	ALI 1.25 mg/kg	ALI 2.5 mg/kg	ALI 5 mg/kg
WBC ($10^9/L$)	14.5 \pm 1.63	13.1 \pm 1.23	13.4 \pm 1.02	14.2 \pm 2.14
LYM ($10^9/L$)	10.1 \pm 1.49	9.7 \pm 1.24	10.5 \pm 1.02	11.0 \pm 1.76
MON ($10^9/L$)	0.3 \pm 0.10	0.2 \pm 0.08	0.3 \pm 0.31	0.2 \pm 0.09
NEU ($10^9/L$)	2.8 \pm 0.13	3.2 \pm 0.12	2.7 \pm 0.20	2.9 \pm 0.45
LYM%	76.4 \pm 1.93	73.5 \pm 2.80	75.1 \pm 2.78	77.8 \pm 2.20
MON%	2.08 \pm 0.85	1.57 \pm 0.97	2.2 \pm 2.04	1.30 \pm 0.47
NEU%	20.8 \pm 1.26	25.1 \pm 1.73	21.7 \pm 3.35	20.9 \pm 2.06

Legendă: WBC – leucocite; LYM – limfocite; MON – monocite; NEU – neutrofile; LYM/MON/NEU % – % de limfocite, monocite respectiv neutrofile.

Pe baza acestor date experimentale, care evidențiază relația invers proporțională dintre stresul oxidativ și răspunsul imun umoral, s-a presupus un mecanism al imunostimulării de către alicină, care ar implica receptorii de tip *scavenger*. Ipoteza s-a formulat pe baza altor efecte similare pe care o serie de poliglucide le au asupra limfocitelor B, prin intermediul macrofagelor. Studiile au arătat faptul că, *in vivo*, alicina reacționează rapid cu GSH și formează un nou compus, S-alilmercaptoglutationul (**Fig. 15**), care nu mai este cuantificabil prin metoda Ellman.

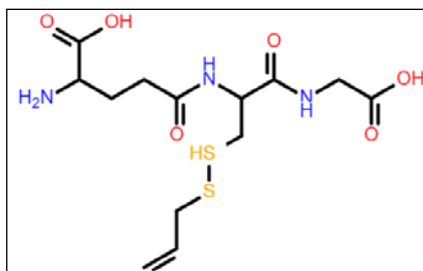


Fig. 15. Structura S-alilmercaptoglutationului, construită în Gauss View Version 5 (după Dennington și colab., 2018).

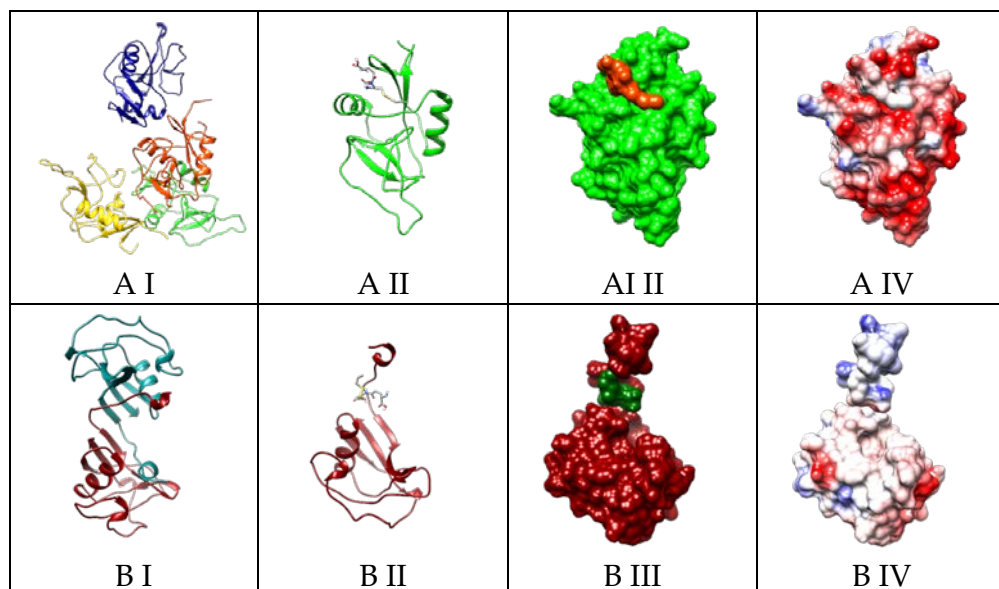
Acest fapt argumentează scăderea GSH, care s-a observat în urma tratamentului cu alicină. În vederea verificării ipotezei conform căreia, anumiți receptori de tip *scavenger* ar fi responsabili de acțiunea imunostimulatoare a alicinei, s-au selectat receptorii Colec12, MARCO, Msr1, SCAR A3, SCAR A5 și SCAR B1, care, pe baza structurii situsurilor de reacție, ar putea interacționa cu alicina, sub forma ei activă *in vivo*, de S-alilmercaptoglutation (SAMG). Rezultatele dockingului molecular au arătat că între SAMG și receptorii Msr1, respectiv SCAR A3, există o specificitate geometrică redusă, iar energia de legare a fost de -4.7 / -4.8 kcal/mol. În schimb, între SAMG și Colec12, MARCO, SCAR A5 și SCAR B1, s-au înregistrat energii de legătură cuprinse între - 5 kcal/mol în cazul SCAR A5 și -6.7 kcal/mol în cazul Colec 12. Specificitatea geometrică a fost foarte mare pentru Colec12, MARCO, SCAR A5 și SCAR B1 (**Tabelul 17**) (Toma și colab., 2019).

Tabelul 17. Caracteristici energetice și de interacțiune geometrică ale unor receptori de tip *scavenger* în interacțiunea cu SAMG.

Ligand	Tip	Energie de legare (kcal/mol)	Specificitate geometrică
Colec12	SCAR A	-6.7	Foarte mare
MARCO	SCAR A	-5.7	Foarte mare
Msr1	SCAR A	-4.7	Foarte scăzută
SCARA 3	SCAR A	-4.8	Foarte scăzută
SCARA 5	SCAR A	-5.0	Scăzută
SCARB 1	SCAR B	-5.7	Foarte mare

Legendă: Colec12 – receptor scavenger cu domeniu tip lectină C; MARCO – receptor macrofagic cu structură colagenică; Msr1 – receptor scavenger macrofagic 1; SCARA 3/5 – clasa A de receptori *scavenger*, tipul 3 respectiv 5; SCARB 1 – clasa B de receptori *scavenger*, tipul 1.

Dintre acești receptori, Colec12, MARCO și SCAR B1 au reunit atât energie de legătură mare (-6.7 kcal/mol pentru Colec12 și -5.7 kcal/mol pentru MARCO și SCAR B1), cât și specificitate geometrică ridicată. S-a constatat, totodată, că, între SAMG și aceste proteine transmembranare din clasa *Scavenger Receptors* se stabilesc legături electrostatice, iar interacțiunea este de tip geometric (potrivire asemenea mecanismului cheie-broască) (Fig. 16) (Toma și colab., 2019).



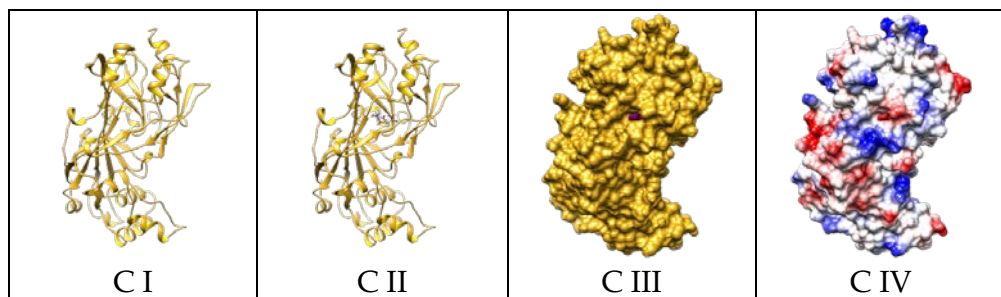


Fig. 16. Geometria receptorilor scavenger și modele de interacțiune între SAMG și receptorii scavenger selectați. **I:** AI-Colec12 (quadrimer); BI-MARCO (dimer); CI-SCAR B1. **II:** Geometria sistemului SCAR-SAMG după docking; pentru o mai bună vizualizare a situsului de legare, figura reprezintă doar un monomer de la fiecare receptor: AII-Colec12 (monomer A); BII-MARCO (monomer A); CII-SCAR B1. **III:** Suprafețele de interacțiune SAMG – sistemul SCAR după docking. **IV:** Suprafețele coulombice ale sistemului SAMG-SCAR, unde cu roșu este reprezentată încărcătura electric negativă, iar cu albastru, încărcătura electric pozitivă.

5.4.2. Acțiunea alicinei asupra limfocitelor B CD19+

Pe baza datelor experimentale obținute, în studii *in vivo* pe șobolanul alb din rasa Wistar, am conceput a doua parte a experimentului, folosind limfocite B CD19+. Aceste cercetări, au avut obiectivul de a verifica dacă SAMG poate să acționeze direct asupra receptorilor scavenger limfocitari sau efectul de stimulare a limfocitelor B CD19+ a fost condiționat de macrofage și limfocite T. Celulele au fost tratate cu trei doze diferite de alicină, stabilite în raport cu volumul de distribuție al acesteia. În paralel, s-au testat aceleași doze ale alicinei, dar în prezența GSH 1 mM, fapt care a favorizat formarea SAMG. S-a constatat că, prezența GSH, prezent în mediu, stimulează activitatea antioxidantă a alicinei prin formarea SAMG (**Fig. 17**). Mai mult, răspunsul imun al limfocitelor B CD19+ a fost condiționat de prezența GSH. Alicina simplă nu a generat creșterea eliberării de imunoglobuline de către limfocitele B CD19+, iar alicina + GSH a condus la creșteri deosebit de proeminente ale proteinelor totale și ale imunoglobulinelor (**Fig. 18**) (Toma și colab., 2019).

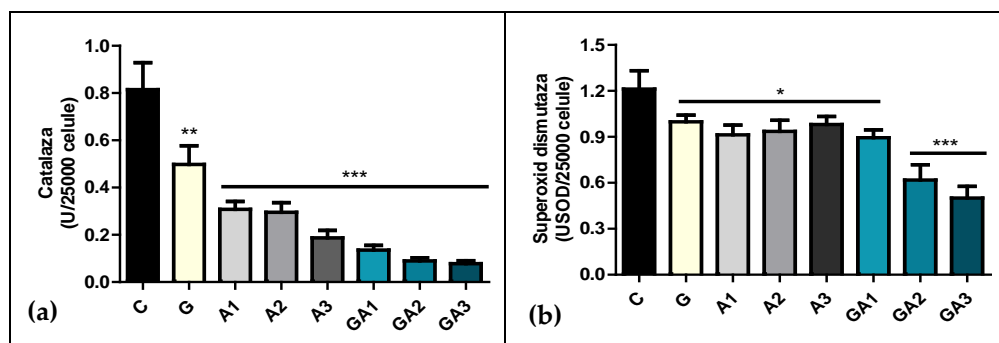


Fig. 17. Valorile activității CAT (a) și SOD (b) asociate celulelor B CD19⁺, expuse la alicină, respectiv alicină + GSH. Prezența GSH conduce la formarea spontană a SAMG, ale cărui bioactivități au fost mai proeminente decât cele ale alicinei simple. GA1-GA3, atât în cazul catalazei, cât și în cel al superoxid-dismutazei, au manifestat activități mai scăzute ale acestor enzime ale stresului oxidativ, decât grupurile A1-A3. G reprezintă grupul tratat cu GSH. Valorile sunt exprimate ca medie \pm SD.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

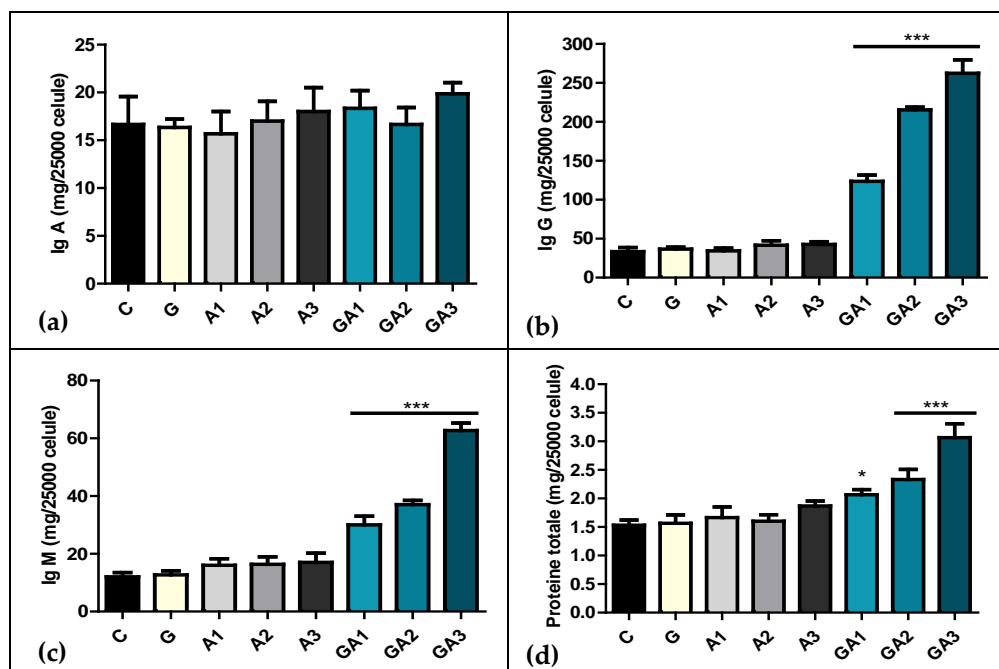


Fig. 18. Concentrațiile IgA (a), IgG (b), IgM (c) și ale proteinelor totale (d) în raport cu lotul de Control, corespunzătoare la 25.000 de celule B CD19⁺ expuse alicinei (A1-A3), alicinei + GSH (GA1-GA3) și glutatoniului redus (G). Valorile sunt exprimate ca medie \pm SD.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

5.5. Discuții

Implicațiile stresului oxidativ, în procesele patologice ale sistemului nervos sau în funcționarea normală a organismului, au fost demonstrate și de studiile noastre, folosind șobolanul alb din rasa Wistar (Sevastre-Berghian și colab., 2017). În situația terapiei cu diazepam, cu scopul generării unor dezechilibre redox și comportamentale (tulburări de memorie, anxietate), tratamentul cu curcumină a avut efecte antioxidante. Creierul prezintă o susceptibilitate crescută la stres oxidativ, întrucât țesutul cerebral are un conținut ridicat în acizi grași polinesaturați, vulnerabili la atacul radicalilor liberi și cu capacitate antioxidantă scăzută. La acestea, se adaugă consumul intensiv de oxigen, metabolismul catecolaminelor și eliberarea neurotransmițătorilor, considerați ca importante surse de radicali liberi (Rink și colab., 2011; Krolow și colab., 2014). Studii recente au sugerat că stresul oxidativ, disfuncții mitochondriale sau inflamația joacă un rol important în apariția tulburărilor de memorie, a anxietății și patologiilor cardio-vasculare asociate cu tulburarea anxioasă (Uma și colab., 2010; Chakravarthi și Avadhani, 2013; Bigoniya și Shukla, 2015).

Activitatea antioxidantă, imunomodulatoare și neuromodulatoare a curcuminei a fost testată, în condiții de stres oxidativ și tulburare anxioasă, induse cu diazepam, la șobolanul alb din rasa Wistar. Unii autori au explicat efectul antiinflamator al curcuminei, prin acțiunea inhibitoare a acesteia asupra NF- κ B și ERK $\frac{1}{2}$ și prin reducerea nivelurilor IL-6, IL-1 β , TNF- α și iNOS, în creierul unor șoareci transgenici (Abu-Taweel și colab., 2013; Liu și colab., 2016). Sistemul NF- κ B este larg exprimat la nivelul telencefalului (Turillazzi și colab., 2016), iar calea de semnalizare NF- κ B poate fi activată de o serie de factori, printre care se numără molecule provenite de la agenți patogeni (lipopolizaharide), citokine, chemokine,

neurotransmițători, factori neurotrofici, corticosteron sau radicali liberi (Olivera și colab., 2012; Turillazzi și colab., 2016; Sankpal și colab., 2016).

Datele noastre experimentale au arătat că diazepamul a crescut nivelurile NF- κ B (**Fig. 9a, Fig. 9b**) și ERK $\frac{1}{2}$ (**Fig. 10**) și a amplificat activarea NF- κ B atât în hipocamp, cât și în lobul frontal (Sevastre-Berghian și colab., 2017). Curcumina a scăzut exprimarea și activarea NF- κ B, respectiv pNF- κ B (**Fig. 9a, Fig. 9c**), alături de ERK $\frac{1}{2}$ și iNOS (**Fig. 9d**), în hipocampus animalelor tratate cu diazepam. În lobul frontal, administrarea curcuminei la animalele tratate cu diazepam, a indus activarea NF- κ B și creșterea nivelurilor ERK $\frac{1}{2}$. Aceste acțiuni contradictorii pot fi explicate, pe baza heterogenității regionale, privind densitatea receptorilor benzodiazepinici și diferențele legate de accesibilitatea liganzilor la receptori, în condiții de stres oxidativ (Kramer și colab., 1986). Peroxidarea lipidică crește vâscozitatea membranară și alterează cuplarea receptorilor cu sistemul molecular efector. Creșterea peroxidărilor lipidice (Sevastre-Bergian și colab., 2019), chiar dacă a fost nesemnificativă statistic, a indus în lobul frontal, la lotul DZP + CUR + CMC, alterarea receptorilor membranari și creșterea exprimării NF- κ B, ERK $\frac{1}{2}$ și, totodată, activarea NF- κ B. Interesant a fost, de asemenea, efectul observat al curcuminei asupra exprimării NF- κ B în hipocamp și lobul frontal și activarea factorului de transcriere nuclear κ B doar în hipocamp. Studiile au mai demonstrat că, NF- κ B a fost activat în sistemul nervos central de către stimuli precum, factori de creștere și glutamat, iar activarea acestui factor de transcriere a condus la modularea plasticității sinaptice, a învățării și a memoriei de lungă durată (McDonald și colab., 2001; Meffert și colab., 2003).

Pe lângă aspectele observate prin Western blot, datele histopatologice (**Fig. 11**) nu au demonstrat efecte asupra hipocampusului, respectiv cortexului prefrontal, decelabile prin colorația uzuală hematoxilină-eozină. Sub aspectul stresului nitrooxidativ, evaluarea exprimării tisulare a iNOS (enzimă responsabilă cu sinteza NO) a fost complementară analizei Western blot. Un studiu recent a arătat că blocarea

genei pentru NOS (iNOS, eNOS, nNOS), pe fond de tulburare anxioasă, a fost asociată cu apariția unui fenotip anxiolitic, ceea ce demonstrează implicarea NO și NOS în apariția și evoluția anxietății (Zhang și colab., 2010). Rezultatele noastre au arătat că, administrarea curcuminei la șobolani Wistar tratați cu diazepam, a scăzut imunoreactivitatea pentru iNOS (**Fig. 12**) a neuronilor CA3 hipocampici și corticali frontali, în comparație cu lotul DZP. Aceste date experimentale au evidențiat stresul nitrooxidativ ca agent etiologic al tulburării anxioase (Sevastre-Berghian și colab., 2017).

Revenind la definiția pe care am elaborat-o la începutul Capitolului 3 (pag. 43), unde stresul era caracterizat ca *perioada de debalansare indusă de o seamă de factori fizici sau chimici prin care un biosistem aflat în echilibru (homeostază) trece, aflându-se într-o continuă tendință de adaptare, limita dintre normal și patologic este redată de timpul de acțiune al stresorului și de timpul de reacție al biosistemului*. Un stresor puternic va genera stres oxidativ într-o măsură pe care organismul nu o va putea „tampona”, astfel, trecerea de la stresul oxidativ, ca *rezultat secundar normal al proceselor metabolice*, la stresul oxidativ, ca *agent etiologic al diverselor patologii*, se face foarte rapid. Studiarea stresului oxidativ în condiții normale, urmată de intervenția cu un agent antioxidant, precum alicina, a scos la lumină, câteva relații existente între prezența radicalilor liberi și reacția imună, situație prefigurată de datele noastre anterioare privind bioactivitatea curcuminei (Toma și colab., 2019).

Rabinkov și colab. (2000) au demonstrat formarea SAMG, în urma reacției dintre alicină și GSH, iar studiile noastre s-au orientat pe bioactivitatea acestui compus. Formarea SAMG are loc, în mod natural, doar în condiții *in vivo*, unde alicina întâlnește glutatiunea redus în vederea generării *forme active in vivo* a alicinei, care este S-alilmercaptoglutațiunea (SAMG). Activitatea antioxidantă a alicinei a fost bine caracterizată prin metode *in vitro* și *in chemico*, precum cele cu DPPH, Trolox sau cele bazate pe oxidarea hemoglobinei (Moț și colab., 2016).

Salehi și colab. (2019) au arătat că, administrarea *in vivo* a alicinei a scăzut concentrația GSH și a grupărilor sulfhidril din sânge, ceea ce susține datele noastre experimentale, aparent contradictorii. Compusul format în urma reacției dintre alicină și GSH nu mai este măsurabil prin metoda tradițională Ellman cu acid ditionitrobenzoic (DTNB), astfel, concentrația GSH, respectiv -SH a marcat o scădere (Toma și colab., 2019).

Datele noastre experimentale au arătat că, în urma administrării alicinei, activitatea CAT a scăzut în raport invers proporțional cu dozele de alicină (**Fig. 13a**), în timp ce activitatea SOD (**Fig. 13b**) nu a prezentat variații semnificative. Aceste date au demonstrat că nu există, în mod obligatoriu, o relație de directă proporționalitate, între CAT și SOD, cu toate că, SOD este enzima care livrează substrat pentru CAT. Totodată, creșterea CAT nu înseamnă întotdeauna creșterea stresului oxidativ (Toma și colab., 2017; Toma și colab., 2019).

Studiile au arătat că, valorile parametrilor stresului oxidativ, în special enzime ca SOD, CAT și GPX variază atât în raport cu modelul biologic utilizat, cât și cu momentul recoltării probelor. Astfel, trei zile de stres neuropsihic au determinat creșterea CAT sangvine la valoarea absolută de 64 U/mL, iar șapte zile de stres neuropsihic au condus la o valoare absolută a CAT din sânge de 67 U/mL, față de Control, unde CAT avea o valoare absolută de 40 U/mL; creșterea, în decursul a șapte zile, nu a fost semnificativă față de valoarea CAT determinată după trei zile de stres neuropsihic (Toma și colab., 2017). Sagor și colab. (2015) au menționat scăderea CAT în plasmă, la valoarea absolută de 2.9 U/mL, după expunerea șobolanilor Wistar la doze repetate de CCl₄ – xenobiotic generator de radicali triclorometil, puternic prooxidanți – în timp ce, la animalele de Control, valoarea absolută a CAT a fost de 6 U/mL. Expunerea șobolanilor Wistar, la hemoglobină nativă, agent puternic prooxidant, după 12h de la administrarea intravenoasă, a determinat o valoare absolută a CAT de 280 U/mL, în timp ce la lotul Control, s-a determinat o activitate a CAT de 118 U/mL (Toma și colab., 2016). Aceste

date demonstrează că, agentul stresor și mai cu seamă momentul recoltării probelor, sunt hotărâtoare în ceea ce privește valorile enzimelor stresului oxidativ.

S-a putut observa că, un agent puternic prooxidant scade activitatea CAT (cazul CCl_4), un alt agent prooxidant, crește activitatea CAT (cazul hemoglobinei native) sau un factor stresor care generează stres oxidativ, chiar dacă a acționat mai mult timp, nu a determinat creșterea semnificativă a CAT în sânge. În cadrul datelor noastre experimentale, absența variațiilor SOD și scăderea CAT au sugerat faptul că, radicalii superoxid nu sunt generați, iar nivelul peroxizilor a scăzut. Scăderea CAT a putut fi relaționată cu un nivel scăzut al stresului oxidativ, deoarece CAT a scăzut atât în ser cât și în culturile de limfocite B CD19+, în timp ce SOD nu a prezentat modificări în ser, dar în culturile de limfocite B CD19+ a scăzut (**Fig. 17**). În plus, catalaza este o enzima antioxidantă din *eșalonul 2* de intervenție (Chance și colab., 1979), prima enzimă care acționează asupra peroxizilor fiind glutathion-peroxidaza (GPX). Astfel, interpretarea modificărilor CAT a ținut cont de competiția existentă, între CAT și GPX, dar și de variațiile SOD. Aparenta contradicție, între tendința de creștere a SOD și scădere a CAT în ser, a relevat caracterul polifactorial al răspunsului antioxidant *in vivo*, în timp ce *in vitro* (limfocite B CD19+), SOD și CAT au variat în tandem. Nivelurile CAT și SOD au fost scăzute *in vitro*, întrucât producția de superoxizi a fost balansată de efectul direct de *scavenging* al alicinei, respectiv SAMG (Lund și colab., 2005; Trio și colab., 2014; Salehi și colab., 2019). În acest context, diferența majoră între ser și limfocitele B CD19+ a fost faptul că, sistemele *in vivo* utilizează mecanisme antioxidante complementare (antioxidanți nonenzimatici, reglare hormonală, reacții ale matricei tisulare etc.), în timp ce limfocitele B CD19+ au fost un sistem izolat. Balanța oxidativă a fost normalizată de către SAMG, precum și imunitatea mediată umoral. Relația dintre stresul oxidativ și inflamația sistemică sau reacția imună locală, mediată de citokine (IL-6, IL-8, etc.) și factori de transcriere (ex. NF- κ B), a fost

menționată în capitolele anterioare. Astfel, s-a pus problema relației directe dintre statusul redox, în condiții nepatologice, și reacția imună. Studiile au arătat efectul stimulator, asupra imunității mediate umoral, al usturoiului, al cepei (Jafari și colab., 2008; Arreola și colab., 2015) și al altor reprezentanți ai genului *Allium* (ex. *A. oliquum*, *A. ursinum*), fără să realizeze o corelație, între nivelul stresului oxidativ din sânge și concentrația serică a imunoglobulinelor, sau cu date din hemogramă (Schäfer și Kaschula, 2014; Arreola și colab., 2015). Datele noastre supuse PCA (*Principal Component Analysis*) (**Fig. 19**) demonstrează corelația negativă între markerii stresului oxidativ și imunoglobuline (Toma și colab., 2019).

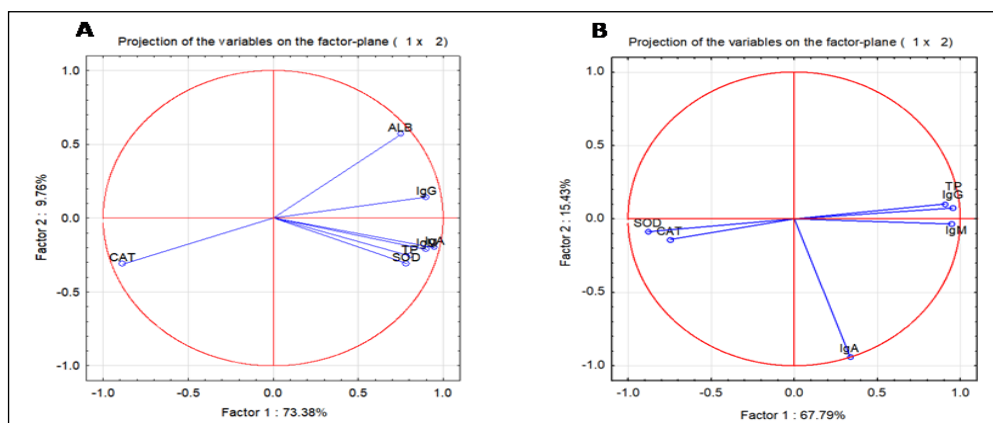


Fig. 19. Diagrame de corelație între parametrii determinați din ser (A) și din limfocitele B CD19+ (B), folosind modelul PCA (Principal Component Analysis). În ser, o corelație negativă între CAT și imunoglobuline și o corelație pozitivă între SOD și imunoglobuline a demonstrat că stresul oxidativ influențează direct, sinteza anticorpilor. În studiile *in vitro*, CAT și SOD au fost negativ corelate cu imunoglobulinele. Prin prisma PCA, studiile *in vitro* au confirmat asumția bazată pe datele provenite de la șobolanii Wistar, conform căreia, pe măsură ce stresul oxidativ a scăzut, sinteza și eliberarea imunoglobulinelor a fost amplificată.

Unii autori au menționat implicarea IL-1 și TNF- α (Dinarelo, 2000; Jayanthi și Dhar, 2011), în stimularea răspunsului imun umoral asociat

preparatelor cu alicină. Datele noastre au arătat faptul că SAMG a determinat creșterea semnificativă ($p < 0.001$) a imunoglobulinelor atât la șobolanul Wistar (**Fig. 14 a-c**), dar fără modificarea parametrilor leucocitari (**Tabelul 16**), cât și *in vitro* (limfocite B CD19+) (**Fig. 18 a-c**) (Toma și colab., 2019). Formarea *in vivo* a SAMG și efectul imunostimulator al acestuia, atât *in vivo* cât și *in vitro*, a condus la ipoteza acțiunii acestuia asupra unor receptori localizați pe limfocitul B. S-a constatat, de către unii autori (Tzianabos, 2000; Ferreira și colab., 2015), că molecule, precum proteine, peptide, lipopolizaharide, glicoproteine sau derivați lipidici, pot genera un răspuns imun umoral prin intermediul unor receptori de tip scavenger, localizați pe macrofage. Mai mult, aceiași autori au demonstrat că, IgM este principala fracțiune gamaglobulinică ale cărei creșteri au fost remarcate după expunerea la antigeni precum, glucani, manani, polizaharide-proteine sau acid hialuronic. Pe baza acestor date publicate, s-a presupus că SAMG ar acționa în mod similar, prin intermediul unor receptori scavenger, dar localizați pe limfocitul B CD19+. Jördo și colab. (2011) au demonstrat prezența receptorilor SCAR B1 (clasa B1 a receptorilor *scavenger*) la nivelul limfocitului B. Pe baza acestor date publicate, s-au efectuat o serie de simulări moleculare de interacțiune, între SAMG și SCAR B1, la care s-au adăugat receptorii Colec12, MARCO, Msr1, SCAR A3, SCAR A5, pe care literatura îi descria cu implicații în răspunsul imun umoral nespecific (Jördo și colab., 2011; Arredouani, 2014; Zhang și colab., 2018). Rezultatele noastre experimentale au demonstrat faptul că SAMG prezintă o specificitate geometric ridicată cu receptorii Colec12, MARCO și SCAR B1, iar energiile de legare, cele mai mari, au fost în cazul acelorași receptori. Pe baza datelor experimentale obținute și a bazei de date KEGG, s-a construit calea de sinteză a imunoglobulinelor, sub acțiunea SAMG (**Fig. 20**) (Toma și colab., 2019).

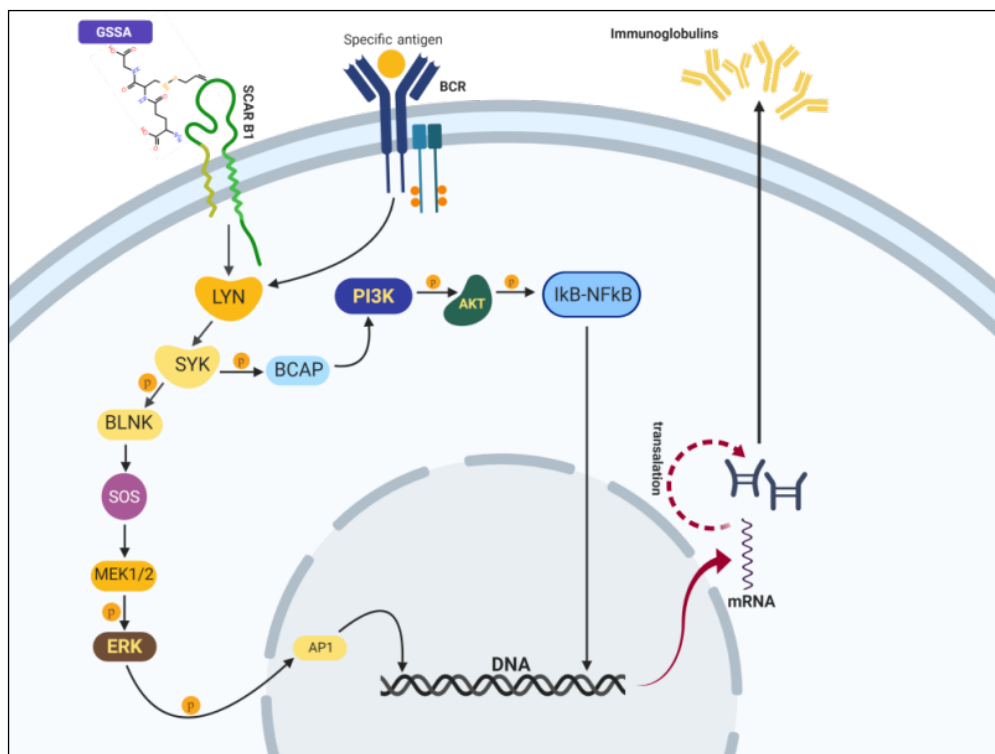


Fig. 20. Calea de sinteză a imunoglobulinelor, de către limfocitul B CD19+, sub acțiunea SAMG (detalii în text).

Date fiind rezultatele lui Jördo și colab. (2011), calea de semnalizare a SAMG s-a conturat în jurul receptorului SCAR B1. Receptorii Colec12 și MARCO nu au fost identificați la nivelul limfocitului B CD19+, prin metode robuste, dar nu s-a exclus posibilitatea implicării acestor receptori în semnalizarea celulară a SAMG, în creșterea și eliberarea imunoglobulinelor. Colec12, MARCO și SCAR B1 se regăsesc ca receptori transmembranari la macrofage (Jördo și colab., 2011). Receptorul SCAR B1 a fost descris, inițial, ca receptor pentru HDL (Schäfer și colab., 2009), iar ulterior s-au adăugat estradiolul și vitamina E ca agoniști pentru SCAR B1 (Martineau și colab., 2014).

SAMG poate acționa în vederea creșterii concentrației serice a imunoglobulinelor A, G și M prin două căi: (i) calea indirectă *via* macrofage cu receptori scavenger din clasa A (Colec12, MARCO) și

receptori scavenger din clasa B tip 1 (SCAR B1); (ii): calea directă, prin interacțiunea SAMG cu receptori scavenger din clasa B, tipul 1 (SCAR B1) de la nivelul limfocitelor circulante de tip B. Ambele căi se intersectează cu calea de semnalizare a receptorului celulelor B (BCR), la nivelul tirozinkinazei LYN, respectiv SYK. Tirozinkinaza SYK poate direcționa cascada de reacții către PI3K sau către activarea ERK. Coactivarea PI3K-ERK este, de asemenea, o etapă posibilă în cross-talk-ul semnalizării receptorului SCAR B1-BCR. În secreția imunoglobulinelor *via* BCR, sistemul LYN/SYK-ERK reprezintă principala cale de semnalizare destinată co-stimulării BCR. Astfel, SAMG, prin calea directă, (PI3K sau ERK) conduce la transcrierea, traducerea, foldingul post-traducere și eliberarea imunoglobulinelor de către limfocitul B. Prezența stresului oxidativ influențează negativ împachetarea proteinelor și restul proceselor asociate producerii imunoglobulinelor. Alicina, prin intermediul SAMG, dezvoltă reacții de *radical scavenging* și joacă rolul unui *epimetabolic keeper* (gardian epimetabolic) (Toma și colab., 2019).

5.6. Concluzii

Stresul oxidativ, asociat cu neuropatologii (tulburări de memorie, anxietate) sau cu modularea reacției imune, a demonstrat caracterul pleiomorf al reactivității modelului biologic folosit. S-a observat activitatea antioxidantă cerebrală a curcuminei, prin modularea căii de semnalizare mediată de NF- κ B, ERK1/2 și iNOS, după administrarea unei doze de diazepam (agentul care a destabilizat balanța redox cerebrală). Pe de altă parte, în condiții normale, alicina a jucat un rol de stimulator al limfocitelor B, prin intermediul receptorului SCAR B1, a cărui cale de semnalizare s-a intersectat cu cea a BCR (B Cell Receptor), conducând la amplificarea secreției de imunoglobuline. În paralel, cu creșterea sintezei și eliberării imunoglobulinelor, stresul oxidativ a fost diminuat. Mai mult, o serie de date experimentale obținute de noi au demonstrat că, există relații de

inversă sau directă proporționalitate între stresul oxidativ și reacția inflamatorie sistemică, respectiv răspunsul imun mediat umoral. Modelul biologic, însă, a evidențiat caracterul polifactorial al stresului oxidativ și a demonstrat că, diferiți compuși destinați variatelor scheme de tratament, acționează după legi comune și, totodată, s-a constatat caracterul deosebit de dinamic și, adesea contradictoriu, al parametrilor stresului oxidativ (Toma și colab., 2019).

6.

Acțiunea *in vivo*, a unor extracte vegetale, în patologii asociate cu dezechilibre redox

6.1. Design experimental

Studiul *in vivo*, al activității extractelor vegetale, prezintă, pe de-o parte, avantajul mimetismului ridicat al modelului biologic cu organismul uman și, pe de altă, mimetismul reacțiilor complementare tisular-specifice pe care modele *in vitro* îl ating. După cum s-a menționat în secțiunea 2.3.1. *Bioactivitate la extracte vegetale – o paradigmă în fitoterapie* (pag. 29), neajunsul, adesea observat în cercetarea *in vivo* a extractelor vegetale, este absența testelor cu compusul specific speciei din care s-a obținut extractul. Astfel, multe cercetări, cu privire la bioactivitatea unui extract vegetal, nu pot distinge acțiunea sinergică a compușilor pe care extractul îi conține, de acțiunea unui compus specific speciei sau genului din care s-a obținut extractul. În cele din urmă, efectele adjuvante, preventive sau terapeutice ale preparatelor din plante (extracte apoase, tincturi, ceaiuri, siropuri etc.) sunt cele pe care literatura de specialitate le aduce în față, acceptând însă limitarea generată de absența – adesea – a studiilor cu compușii specifici.

După cum am mai menționat, trebuie făcută distincție între bioactivitatea generală și bioactivitatea specifică a extractelor vegetale. Dacă în bioactivitatea generală se încadrează proprietățile antioxidante și antiinflamatoare ale extractelor, activitatea specifică este evidențiată în urma administrării extractului în situații patologice induse (modele experimentale pentru patologii). **Tabelul 18** sumarizează designul

experimentelor care au inclus extracte vegetale de *Lamium*, *Vaccinium*, *Galium*, *Malus*, *Hypericum* și *Cornus*, administrate în diferite contexte patologice induse. Astfel, s-a putut evidenția activitatea specifică a extractelor și s-au creat premisele testării anumitor compuși (ex. subtipurii de iridoide din *Lamium*, arbutozida din *Vaccinium*) sau a cercetării aprofundate a unor extracte, insuficient caracterizate (ex. extractul de *Malus*).

Extractele vegetale au fost obținute prin repercolare la rece în etanol 96%, iar concentrația alcoolului în extractul final a fost cuprinsă între 15-30%. Extractele de *Lamium*, *Vaccinium*, *Galium*, *Malus* și *Cornus* au fost administrate sub formă de extract fluid, în matrice hidroalcoolică, în timp ce extractul de *Hypericum* a fost desicat și administrat în matrice de carboximetilceluloză. Toate extractele au fost administrate pe cale enterală, la șobolani albi din rasa Wistar, cu vârste cuprinse între 4 și 6 luni, masculi (în studiul extractelor din *Hypericum* și *Cornus*) sau femele (în studiul extractelor din *Lamium*, *Vaccinium*, *Galium* și *Malus*).

Tabelul 18. Designul experimental al testării *in vivo* a extractelor vegetale, în vederea stabilirii bioactivității specifice. MHA – matrice alcoolică; MHGA – matrice hidroglicerolcoolică; MCMC – matrice carboximetilceluloză.

Extract	Model patologic	Loturi experimentale	Durata experimentului	Probe recoltate	Determinări efectuate
<i>Lamium album</i> (LA), <i>Lamium purpureum</i> (LP) - MHA -	stres de imobilizare	Control Stres (2h/zi) Extract LA (200 mg/kg corp/zi) Extract LP (200 mg/kg corp/z) Stres + Extract LA Stres + Extract LP	17 zile	sânge	CHOL, TGL, AA, , CAT, TBARS, CS
				ficat, rinichi, gl. suprarenale, timus	Col. HE
				creier	Col. HE, CHOL, CS, CAT, AA, TBARS, TNF α ,
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> - MHA -	toxicoză hepatică și renală indusă cu etanol	Control Extract (200 mg/kg corp/zi) (E) Alcool (6 g/kg corp etanol 50%/zi) Extract + Alcool	15 zile	sânge	UREA, CREA, TGO, TGP, CHOL, GLUC
				rinichi, ficat	Col. HE
<i>Galium verum</i> - MHA -	stres de imobilizare	Control Extract (250 mg/kg corp/zi) Stres (3h/zi) Extract + Stres	15 zile	hipotalamus, hipofiză, gl. suprarenale	analiza histologică (col. Nissl, col. HE, col. Hurdac)

Extract	Model patologic	Loturi experimentale	Durata experimentului	Probe recoltate	Determinări efectuate
<i>Malus sylvestris</i> - MHGA -	Steatohepatită indusă cu CCl ₄	Control Extract (200 mg/kg corp/zi) CCl₄ (700 μL/kg corp/zi) CCl₄ + Extract	7 zile	sânge	ALT, AST, WBC, LYM, TNFα
				ficat	analiza histologică (Col. HE)
<i>Hypericum perforatum</i> și <i>H. maculatum</i> - MCMC -	anxietate indusă cu FG-7142	Control (CMC) FG-7142 (7.5 mg/kg corp, i.p. doză unică) APZ + FG-7142 (APZ, 0.08 mg/kg corp) Q + FG-7142 (Q, 30 mg/kg corp) HM + FG (HM, 350 mg/kg corp) HP + FG (HP, 350 mg/kg corp)	22 zile	sânge	CS
				creier	MDA, CAT, SOD, IL-1α, IL-1β, MCP1, IFN, MIP, RANTES, NF-kβ, pNF-kβ
<i>Cornus mas</i> (CM) - MHA -	apoptoză indusă cu nanoparticule de argint (AgNP)	Control T7D1 AgNP-CM T7D2 Ag-NP-CM T15D1 Ag-NP-CM T15D2 Ag-NP-CM	15 zile	testicul	analiză histologică (col. HE) imunofluorescență (TUNEL)

Legendă: CHOL – colesterol; TGO/AST – transaminaza glutamat oxaloacetică; TGP/ALT – transaminaza glutamat piruvică; UREA – uree; CREA – creatinină; CAT – catalază; TBARS – specii reactive cu acid tiobarbituric; CS – corticosteron; AA – adrenalină; GLUC – glucoză; WBC – leucocite; LYM – limfocite; TNFα -Factorul de Necroză Tumorală α; MDA – malondialdehidă; SOD – superoxid-dismutază; IL-1α/1β – interleukina 1α/1β; MCP1- proteina chemoatractantă macrofagică1; IFN – interferon; MIP – proteina inflamatorie macrofagică 1; RANTES – factor de reglare a funcției secretorii și a adeziunii limfocitelor T; NF-kβ/pNF-kβ – factorul nuclear kβ/forma activată.

6.2. Protocoale experimentale

6.2.1. Metode spectrofotometrice

Metodele spectrofotometrice au fost folosite pentru determinarea activității catalazei, pentru cuantificarea proteinelor totale, albuminei și glutatationului. Tehnicile folosite au fost reprezentate de spectroscopia UV-vis, cu ajutorul căreia se corelează o reacție de culoare apărută în urma unei reacții specifice (relație direct proporțională) sau stingerea semnalului unei anumite molecule (relație invers proporțională), cu

concentrația moleculei de interes/de dozat. Prin aceste metode s-au determinat concentrațiile: CHOL, TGL, TGO, TGP, UREA, CREA, TBARS, AA, GLUC și activitatea CAT și SOD. MDA a fost determinată prin metoda fluorimetrică, după descrierea lui Conti și colab. (1991) (Roman și colab., 2016; Roman și colab., 2017; Toma și colab., 2018).

6.2.2. *Western blot și ELISA*

Metoda Western blot a fost aplicată în cuantificarea NF- κ B și pNF- κ B din probe de hipocamp, respectiv lob frontal. Prin ELISA (kituri specifice de la IBL – International, Hamburg, Germania) s-au cuantificat CS, TNF α , IL-1 α , IL-1 β , MCP1, IFN, MIP și RANTES. Pentru Western blot, lizatele tisulare (creier, ficat) (20 μ g proteină/bandă) au fost separate prin electroforeză în gel SDS PAGE 8%, apoi au fost transferate pe membrane de polivinilidenflourură (BioRad). Bloturile au fost apoi blocate și incubate cu anticorpi NF- κ B și pNF- κ B (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germania) diluați 1:500. După spălare, bloturile au fost incubate cu anticorpii secundar corespunzător cuplat cu HRP, diluție 1:500 (Santa Cruz Biotechnology). Proteinele au fost vizualizate și detectate, folosind un substrat de tipul *Supersignal West Femto Chemiluminiscent* împreună cu un sistem de vizualizare a gelului. Proteina de control a fost GAPDH. Rezultatele au fost exprimate ca unități de densitate optică/mg proteine. Pentru ELISA, lizatele tisulare (creier, ficat) au procesate după instrucțiunile producătorului. Rezultatele au fost exprimate ca medie \pm SD (Sevastre-Berghian și colab., 2018).

6.2.3. *Analiza hematologică în flux*

Sângele recoltat pe EDTA K₂ 4% (sarea dipotasică a acidului etilendiaminotetraacetic), 50 μ L/tub recoltare, desicat în prealabil, a fost supus analizei hematologice, folosind un analizor automat de tip Abacus

Diatron. Acesta emite un fascicul laser prin dreptul căruia trece fluxul de probă (sânge integral) împreună cu reactivul specific de diluție și liză. Astfel, s-au măsurat diametre celulare (eritrocite, leucocite, trombocite), s-a cuantificat numărul de celule și s-a determinat concentrația hemoglobinei sangvine. Aparatul a calculat, astfel, indicii eritrocitari, leucocitari respectiv trombocitari (Toma și colab., 2018).

6.2.4. Examen histopatologic și imunohistochimic

Pentru analiza histologică, probele au fost fixate în formaldehidă neutră 10%, timp de 3 zile. După fixare, țesutul a fost histoprosesat și inclus în parafină. Din blocurile de parafină obținute, s-au efectuat secțiuni groase de 5 μ m, care au fost apoi supuse colorației hematoxină-eozină (ficat, rinichi, glande suprarenale, creier, testicul), Nissl (creier) și Hurduc (glanda hipofiză). Examenul histologic și histopatologic s-a efectuat folosind un microscop Optika B-383LD2 cu cameră digitală și modul pentru examenul în fluorescență. Pentru cuantificarea gradului apoptozei (testicul), secțiuni de 5 μ m, deparafinate și hidratate, au fost procesate în acord cu *Situ Cell Death Detection Kit* (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA, REF 11684809910) cu fluoresceină-dUTP care a permis detecția fragmentării AND în fluorescență, direct după reacția TUNEL și adăugarea peste secțiuni a anticorpului conjugat anti-fluoresceină. Examenul microscopic al secțiunilor, s-a realizat în lumină UV, folosind un filtru verde (Toma și colab., 2018; Opriș și colab., 2019).

5.2.5. Analiză statistică

Toate analizele statistice au fost efectuate folosind software-ul GraphPad Prism, versiunea 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Rezultatele au fost exprimate ca medie \pm deviația standard a mediei (SD).

Datele au fost supuse ANOVA, urmată de testul Bonferroni. Valoarea lui p asociat testului post-hoc Bonferroni, mai mică de 0.05, a fost considerată semnificativă statistic. Coeficienții de corelație au fost interpretați după scala Colton. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Toma și colab., 2018).

6.3. Compoziție chimică și acțiunea extractelor de *Lamium album* L. și *Lamium purpureum* L. asupra unor parametri sangvini și histologici, în condiții de stres de imobilizare

Materialul vegetal prelevat din diferite areale a fost uscat pe cale naturală și supus extracției cu solvenți de polarități diferite, pentru evidențierea compușilor cu acțiune antioxidantă de tip polifenolic, flavonoidic, iridoidic, triterpenic etc. Materialul folosit a constatat în exemplare de *Lamium* înflorite, din care s-au luat pentru extracție 2,5 g/100 mL de etanol 96%. Metodele de determinare au fost cromatografia pe strat subțire (CSS), spectrofotometria și cromatografia în fază lichidă de înaltă performanță (HPLC). Separarea s-a efectuat folosind o fază mobilă formată din acetonitril și acetat de sodiu 2 mM (pH = 3.5). După optimizarea condițiilor de lucru cromatografice în vederea separării, au fost injectate soluții etalon de acid galic, acid clorogenic, acid cafeic, acid salicilic, acid ferulic, acid *p*-cumaric, acid *o*-cumaric, acid rozmarinic, acid cinamic, rutozidă (cuercetin-3-O-rutinozida), hiperozidă (cuercetin-3-O-galactozida), luteolin, luteolin-7-glucozidă, apigenol, apigenin-7-glucozidă și quercetol. Pentru aceste etaloane, s-a înregistrat spectrul de absorbție în UV, spectru care a fost salvat în biblioteca de spectre. Acesta a fost utilizat, în continuare, pentru identificarea acestor compuși din extractele vegetale de *Lamium*. **Tabelul 19** sintetizează valorilor principalilor compuși determinați prin HPLC în extracte etanolice de *L. album* și *L. purpureum* (Roman și colab., 2016).

Tabelul 19. Conținutul de acid clorogenic, acid rozmarinic, rutozidă, acid cafeic și subtipuri de iridoide (SME¹, ASME²) la extractul etanolic de *L. album* și *L. purpureum*. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm SD.

Specia	mg/100g material vegetal uscat					
	Acid clorogenic	Acid rozmarinic	Rutozida	Acid cafeic	SME ²⁷	ASME ²⁸
<i>Lamium album</i>	119.2 \pm 1.8	98.0 \pm 1.95	290.7 \pm 2.30	795.4 \pm 1.43	18.7 \pm 1.54	22.6 \pm 1.64
<i>Lamium purpureum</i>	23.03 \pm 0.06	105.21 \pm 2.01	21.97 \pm 0.66	83 \pm 1.74	-	-

Pentru evidențierea activității specifice, la extractele de *L. album* și *L. purpureum*, modelul biologic folosit a constatat în expunerea repetată a șobolanului alb Wistar la stres de imobilizare. Imobilizarea a condus la o serie de modificări morfopatologice (distrofii hepatice, expansiuni glomerulare, imunosupresie, atrofia suprarenalelor, insuficiență tiroidiană și ovariană, glioza și ratatinări cerebrale etc.) față de care, extractele de *L. album*, respectiv *L. purpureum*, au avut acțiune terapeutică. La nivel hepatic (**Fig. 21**), expunerea la stres de imobilizare a animalelor (lotul S), a determinat distrofii clare moderate ale hepatocitelor, aspect asociat cu dilatarea lumenului capilarelor sinusoidale din jurul cordoanelor hepatocitare. Nucleii unor hepatocite au avut forme neregulate, cu volumul redus, prezentând tendințe de picnotizare (**Fig. 21 B**). La lotul LA (**Fig. 21 C**) și la lotul LP (**Fig. 21 D**) aspectul histologic al ficatului a fost foarte apropiat de cel al lotului Control (**Fig. 21 A**). Examinarea histologică, a secțiunilor de ficat la loturile SLA și SLP, expuse stresului anakinetic și tratate concomitent cu cele două extracte vegetale de *Lamium album*, respectiv *Lamium purpureum*, nu a evidențiat, de asemenea, modificări morfologice semnificative ale parenchimului hepatic, comparativ cu lotul Control (Roman și colab., 2017).

¹ 6-shanzhisid metil ester

² 8-acetilshanzhisid metil ester

La nivel renal (**Fig. 22**), la lotul S (**Fig. 22 B**) s-au evidențiat leziuni minore la nivelul porțiunii proximale și distale a tubilor uriniferi, caracterizate prin dilatări moderate, ale lumenului tubilor, care prezintă arii de descuamare celulară de diferite intensități. Corpusculii renali au fost ușor măriți ca volum, cu spațiul mezangiul uneori lărgit subcapsular. La lotul LA (**Fig. 22 C**), tratat cu extract de *L. album*, s-a constatat, prezența pe arii mai extinse, a unor dilatări mai pronunțate ale lumenului tubilor uriniferi, atât pe porțiunea proximală, cât și distală a acestora, modificările nefiind însoțite de descuamări epiteliale. La nivelul corpuscului Malpighi, au apărut modificări celulare și matriceale ale mezangiului glomerular, traduse morfologic printr-o creștere mai mult sau mai puțin marcantă a numărului de celule din structura acestuia, ca urmare a proliferării celulelor mezangiale și endoteliale. Tijele intercapilare care formează țesutul mezangial au fost, de asemenea, mai dilatate (Roman și colab., 2017).

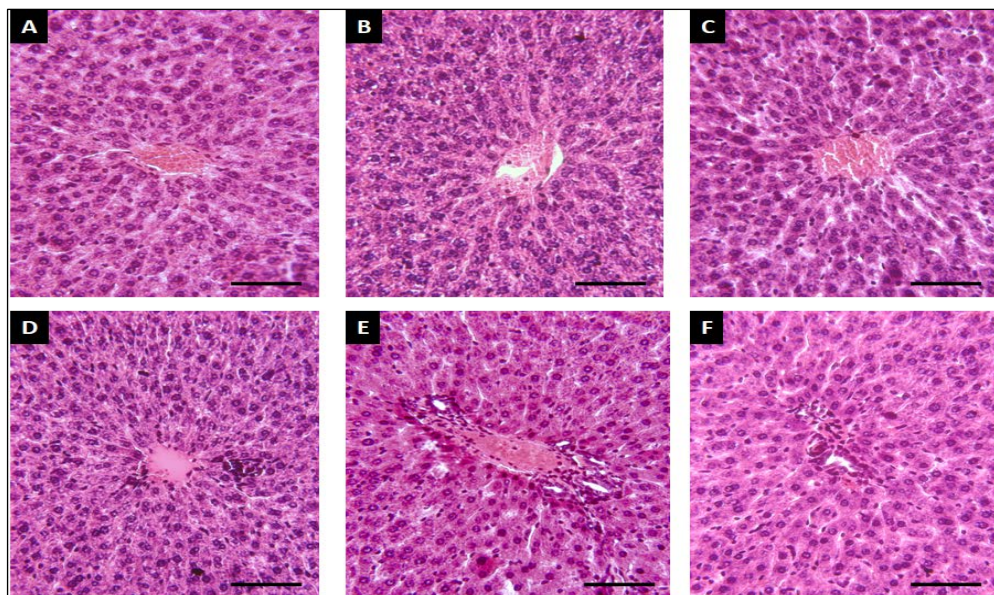


Fig. 21. Aspectul microscopic al ficatului la Control (A), Stres – S (B), *L. album* – LA (C), *L. purpureum* – LP (D), Stres + LA-SLA (E) și Stres + LP-SLP (F). H&E, x 400, scala = 25 μ m.

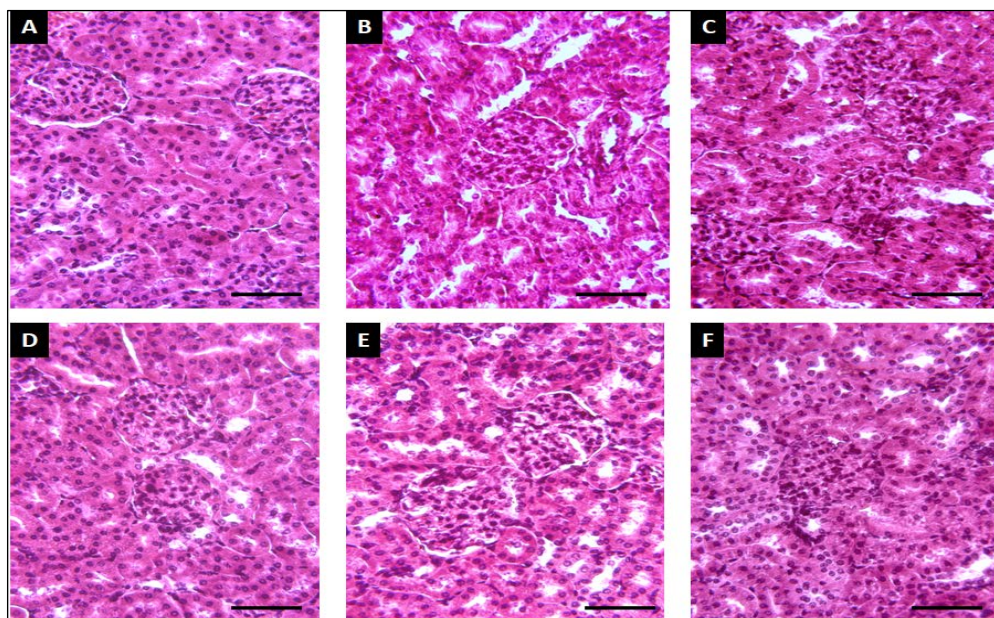


Fig. 22. Aspectul histopatologic al rinichiului la Control (A) și grupurile experimentale. Stres – S (B), *L. album* – LA (C), *L. purpureum* – LP (D), Stres + LA-SLA (E) și Stres + LP-SLP (F). H&E, x 400, scala = 25 μm.

La examinarea histologică a parenchimului renal, la lotul LP (**Fig. 22 D**), tratat cu extract de *L. purpureum*, aspectul morfologic general al parenchimului renal a fost apropiat de cel al lotului Control (**Fig. 22 A**). Porțiunea proximală a tubilor contorți a prezentat dilatări moderate a lumenului acestora. Studiul histologic al rinichiului lotului SLA (**Fig. 22 E**), expus stresului de imobilizare și tratat concomitent cu extract de *L. album*, a evidențiat prezența, pe arii mai extinse, de dilatări ale lumenului tubilor uriniferi, atât pe porțiunea proximală, cât și distală a acestora. Epiteliile au fost aplatizate și, pe alocuri, descumate. Spațiile intercapilare intraglomerulare au fost, de asemenea, dilatate. Modificările morfologice ale rinichiului au fost asociate cu diureza crescută, observată la animalele acestui lot experimental, pe întreg parcursul experimentului. Lotul SLP (**Fig. 22 F**), expus stresului de imobilizare și tratat concomitent cu extract vegetal de *L. purpureum*, nu

a prezentat modificări semnificative ale structurii parenchimului renal, comparativ cu lotul de Control (**Fig. 22 A**) (date nepublicate).

Stresul de imobilizare stimulează axa HHHS³, astfel că, glandele suprarenale (**Fig. 23**) au prezentat modificări histofiziologice caracterizate în termeni generali de atrofie și împuținarea spongocitelor din zona fasciculată a corticosuprarenalei. Examinările histologice au evidențiat un aspect normal al suprarenalelor la lotul Control, cu cele trei straturi constitutive ale corticalei (stratul glomerular, fasciculat și reticulat), bine vizibile și delimitate (**Fig. 23 A**). La lotul S s-a remarcat o subțiere moderată a zonei corticale, îndeosebi a zonei fasciculate, aspect asociat cu o proliferare, de asemenea moderată, a grosimii medulosuprarenalei. În zona fasciculată, au apărut grupări de spongioцитe hipertrofiate, cu nucleii de asemenea hipertrofiați, pline cu incluziuni lipidice, precum și numeroase celule normal constituite, cu citoplasma încărcată cu granule de secreție acidofile, care au sugerat o activitate secretorie crescută a suprarenalei în condițiile de stres experimentale. Capilarele sinusoide ale zonei fasciculate au fost ușor dilatate. Celulele cromafine ale medulosuprarenalei au fost hipertrofiate, fiind grupate în cordoane celulare cu aspect compact (**Fig. 23 B**).

Administrarea extractului vegetal de *L. album*, la lotul LA (**Fig. 23 C**) nu a indus modificări semnificative în morfologia suprarenalelor. S-a remarcat, totuși, o subțiere a grosimii zonei fasciculate, raportul corticală/medulară schimbându-se în favoarea medularei. În zona fasciculată, dar mai ales în cea adiacentă reticulatei, au apărut grupări, de diferite dimensiuni, de celule inactive, cu citoplasmă compactă, lipsite de caracterul spongocitar. Medulosuprarenala, mai redusă ca

³ Într-o accepțiune largă, bazată pe date experimentale (Toma și colab., 2017), axa Hipocamp – Hipotalamus – Hipofiză – Suprarenale (sau axa HHPA: hipocampus – hypothalamus – pituitary – adrenal)

volum, a fost formată din cordoane de celule compacte, printre care apar mici spații lacunare. Administrarea extractului vegetal de *L. purpureum* la animalele lotului LP (**Fig. 23 D**) a avut ca efect o subțiere moderată a corticalei. S-a observat o îngroșare semnificativă a zonei glomerulare; în zona adiacentă fasciculatei, s-a identificat un cordon de celule cu citoplasma inactivă, compacte și închise la culoare (așa numitele *dark cells*). În zona fasciculată, celulele orientate în cordoane paralele nu au mai prezentat aspectul normal spongios, caracteristic. Majoritatea celulelor au avut citoplasma condensată, cu nucleii sferici, bine delimitați. Toate aceste aspecte au sugerat o scădere a secreției hormonilor glucocorticoizi de către suprarenală. Medulosuprarenala a fost bine dezvoltată, fiind formată din cordoane celulare delimitate de spații largi, în care țesutul conjunctiv înglobează capilare sinusoidale dilatate. La lotul SLA (**Fig. 23 E**), care a fost expus stresului de imobilizare și tratat concomitent cu extract de *L. album*, s-a observat o subțiere moderată a grosimii corticalei. În zona fasciculată, au apărut grupări mari de spongioscite cu aspect compact, închise la culoare, cu citoplasma lipsită de incluziuni lipidice. Medulosuprarenala a avut un aspect compact, cordoanele celulare nefiind separate de spații lacunare. Aspecte morfologice ale suprarenalei, apropiate de cele descrise la lotul SLA, au fost observate la lotul SLP (**Fig. 23 F**), care a fost expus stresului de imobilizare și tratat concomitent cu extract de *L. purpureum*. În zona adiacentă glomerulare, au apărut grupări de celule inactive, cu citoplasma condensată, lipsite de conținut lipidic. În profunzimea zonei fasciculate, numeroase spongioscite au prezentat citoplasma balonizată, lipsită de conținut celular, cu nucleu globulos, hipertrofiat. Medulosuprarenala a avut, de asemenea, un aspect compact, cordoanele celulare nefiind separate de spații lacunare (date nepublicate).

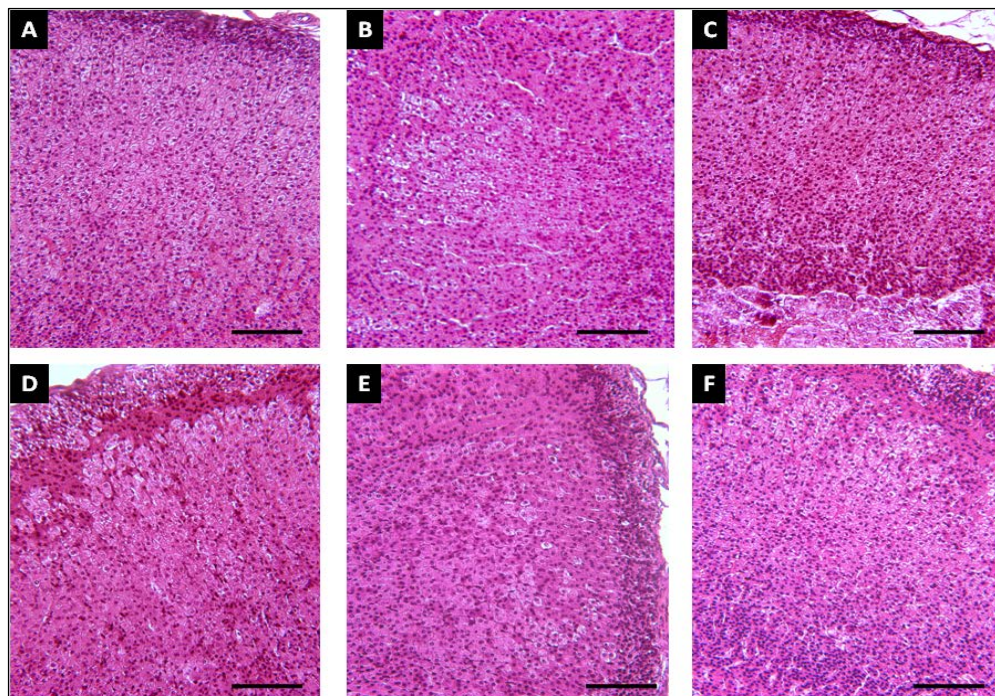


Fig. 23. Structura glandei suprarenale la grupul Control și la loturile experimentale expuse stresului și/sau tratamentului cu extracte de *L. album*, respectiv *L. purpureum*. Control (A), Stres – S (B), *L. album* – LA (C), *L. purpureum* – LP (D), Stres + LA-SLA (E) și Stres + LP-SLP (F). H&E, x 200, scala = 50 μ m.

Analiza histopatologică a timusului a fost, de asemenea, urmărită în vederea identificării activităților specifice extractelor de *Lamium*. Studii anterioare au arătat efectul imunomodulator al diferiților compuși regăsiți în preparate din *Lamium* (Sanchez de Medina și Zarzuelo, 2008), iar rolul timusului în imunitatea mediată celular, în condiții de stres de imobilizare, prezenta un caracter de noutate. La animalele lotului S (**Fig. 24 B**), expuse stresului de imobilizare, lobulii timici au avut forma normală, caracteristică, delimitarea dintre substanța corticală și cea medulară fiind bine distinctă. S-a constatat o creștere a densității timocitelor, respectiv hiperplazia moderată a acestora în corticala lobulilor timici, asociată unei îngroșări a corticalei, comparativ cu lotul Control (**Fig. 24 A**). Zona medulară a fost fragmentată în insule de diferite mărimi. Administrarea extractului vegetal de *L. album*, la lotul LA (**Fig. 24 C**), a avut ca efect

îngroșarea semnificativă îndeosebi a zonei corticale și a condus la proliferarea timocitelor T imature, comparativ cu lotul S. La lotul LP (**Fig. 24 D**), care a fost tratat cu extract de *L. purpureum*, s-a înregistrat o proliferare accentuată a timocitelor din zona medulară. La lotul SLA (**Fig. 24 E**), tratat cu extract vegetal de *L. album* și expus stresului de imobilizare, aspectul general al morfologiei timusului a fost caracterizat prin reducerea grosimii corticalei și a medularei, drept consecință a hipoplaziei populațiilor celulare atât din corticală, cât și din medulară. Expunerea la stresul de imobilizare, a animalelor lotului SLP (**Fig. 24 F**), tratate concomitent cu extract de *L. purpureum*, a avut ca efect o îngroșare mai accentuată a medularei, asociată unei hiperplazii moderate a limfoblastelor din această zonă (date nepublicate).

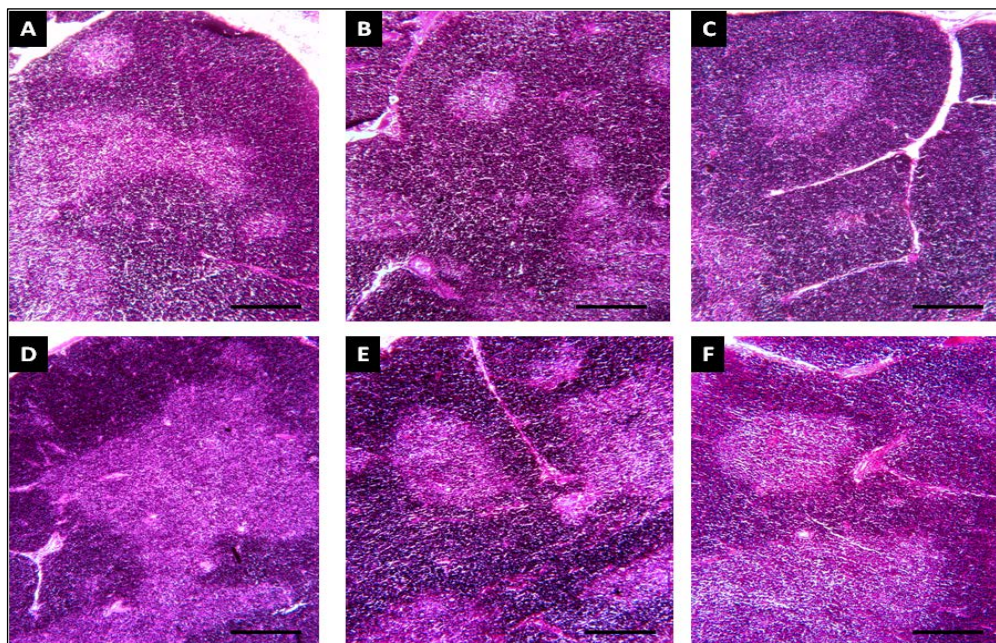


Fig. 24. Structura microscopică a timusului la Control și grupurile experimentale. Control (A), Stres – S (B), *L. album* – LA (C), *L. purpureum* – LP (D), Stres + LA-SLA (E) și Stres + LP-SLP (F). H&E, $\times 200$, scala = 50 μm .

Bioactivitatea extractului de *L. album* s-a remarcat în studiile efectuate până aici, astfel că, cercetarea activităților acestui extract a fost extinsă asupra sistemului nervos, ținând seama de prezența SME și ASME

(iridoide specifice genului *Lamium*) în compoziția extractului. Șobolani albi, din rasa Wistar, femele, au fost expuși timp de 5 zile, câte 3h/zi la stres de imobilizare (lotul RS – Restraint Stress), iar extractul de *L. album* a fost administrat în doză de 200 mg/kg corp, pe cale orală, pe tot parcursul experimentului, după scoaterea animalelor de sub incidența agentului stresor (lotul RS + LA). Apoi, s-a determinat concentrația/activitatea enzimatică, pentru: colesterol, CAT, TBARS, corticosteron din hipocamp (**Fig. 25**), adrenalină, TNF α din hipocamp (**Fig. 26A** și **Fig. 26B**), corticosteron, colesterol din sânge (**Fig. 26C** și **Fig. 26D**), precum și pentru CAT, TBARS și AA din sânge (**Fig. 27A**, **Fig. 27B** și **Fig. 27C**). Evaluarea histologică a urmărit structura girusului dentat (colorație HE) (**Fig. 28**) (date nepublicate).

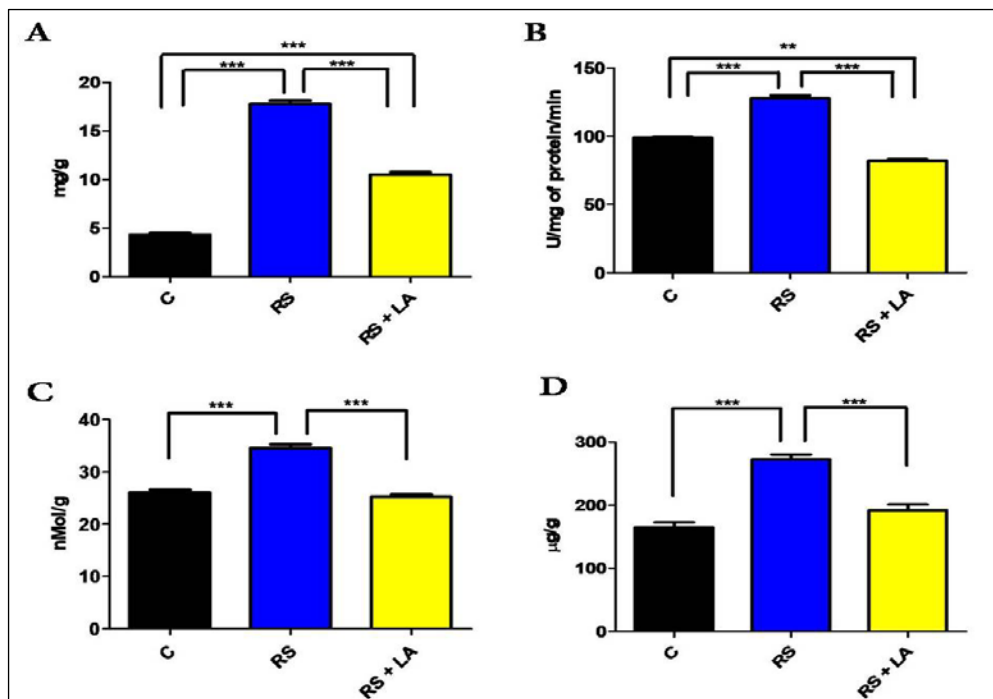


Fig. 25. Valorile colesterolului (A), CAT (B), TBARS (C) și CS (D) din lizatul cerebral (hipocamp) la lotul Control și grupurile experimentale. Valorile sunt exprimate ca medie \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Extractul de *L. album* a diminuat semnificativ ($p < 0.001$) stresul oxidativ (scăderea CAT și TBARS), precum și nivelul colesterolului din

hipocamp, ceea ce a sugerat scăderea nivelului steroizilor rezidenți în țesutul cerebral. Această ipoteză a fost validată prin cuantificarea corticosteronului (Fig. 25D), a cărei concentrație a fost semnificativ scăzută ($p < 0.001$), după administrarea extractului. Totodată, adrenalina și $\text{TNF}\alpha$ (Fig. 26A, Fig. 26B) din hipocamp au scăzut ($p < 0.001$) în raport cu lotul RS.

În sânge s-a păstrat aceeași dinamică, de scădere, după tratamentul cu extract din *L. album*, a valorilor parametrilor determinați. Astfel, corticosteronul (Fig. 26C), colesterolul (Fig. 26D), precum și CAT, TBARS și AA au marcat scăderi ale valorilor concentrației/activității din sânge, după cum este ilustrat în Fig. 27.

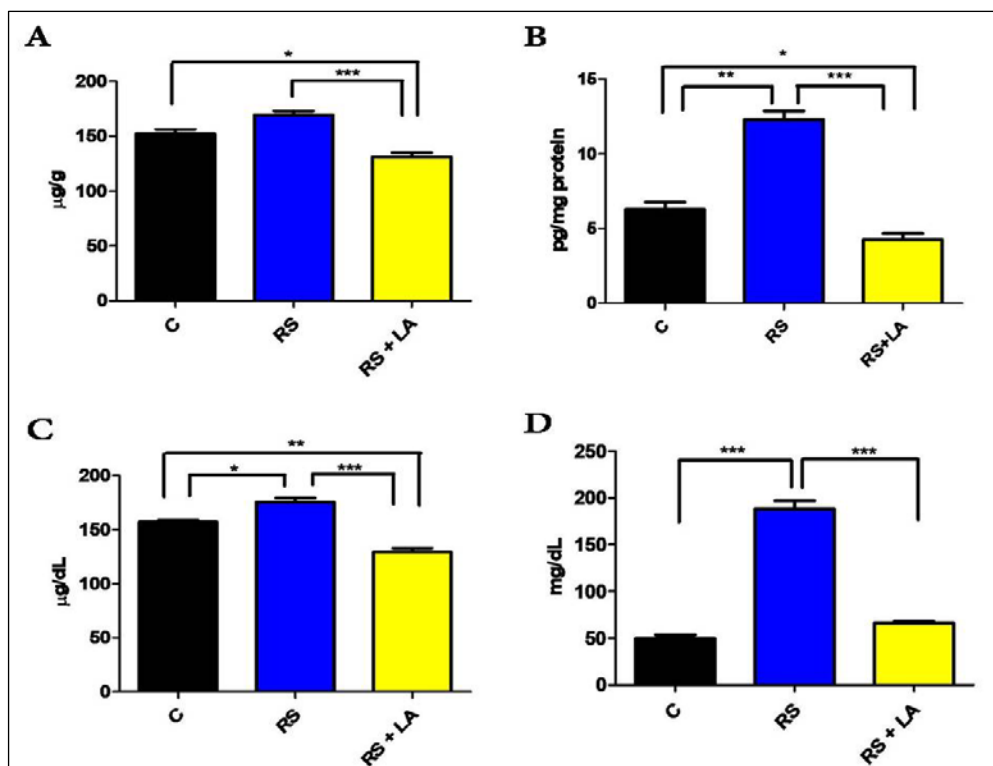


Fig. 26. Valorile concentrației adrenalinei (A) și $\text{TNF}\alpha$ (B) din hipocamp și a corticosteronului (C), respectiv colesterolului (D) din sânge, la lotul Control și grupurile experimentale. Valorile sunt exprimate ca medie \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

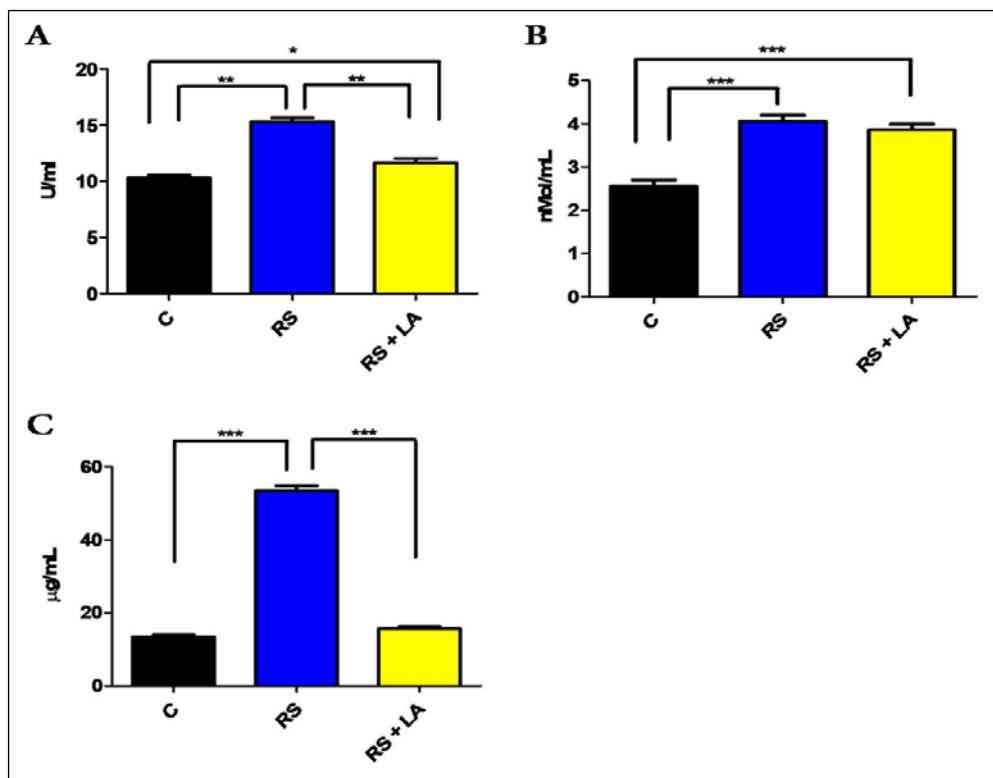


Fig. 27. Valorile activității CAT (A) și a concentrației TBARS (B) și AA (C) din sânge, la lotul Control și grupurile experimentale. Valorile sunt exprimate ca medie ± SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Analiza histologică a girusului dentat (**Fig. 28**) a evidențiat modificări precum procese de tip glioză-like în stratul granular al girusului dentat, cu extindere și în stratul superior. La lotul RS (**Fig. 28B**), s-a remarcat subțierea cordonului de celule granulare și apariția așa numiților *dark neurons* în zona subgranulară. Tratamentul cu extract hidroalcoolic din *L. album* a determinat proliferarea zonei granulare a girusului dentat, proeminența neuronilor granulari, absența neuronilor negri (*dark neurons*) și îngroșarea întregului cordon celular granular. (**Fig. 28C**) (date nepublicate).

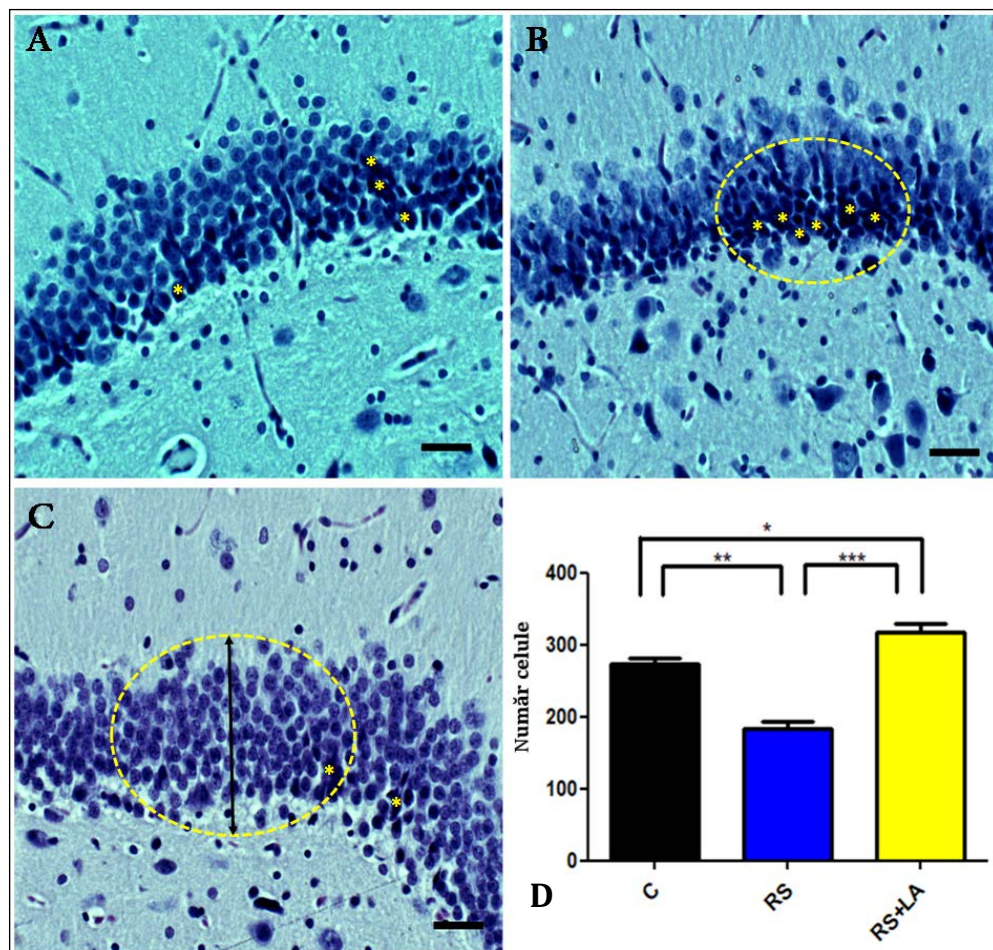


Fig. 28. Structura girusului dentat la Control și la grupurile experimentale. În raport cu Controlul (A), la animalele expuse stresului de imobilizare repetat – lotul RS (B), s-au identificat *dark neurons* (marcați cu asterisc galben), în zona subgranulară, cu tendința de extindere în teritoriul granular și subțierea cordonului celular (linie punctată). Administrarea extractului de *L. album* – lotul RS + LA (C), a determinat regenerarea girusului dentat, marcată prin absența neuronilor *dark* și prin expansiunea și creșterea numărului straturilor de celule granulare ale girusului dentat. Procesul regenerativ indus de *L. album* a fost verificat și prin numărarea tuturor celulelor din girusul dentat (D), în urma căreia s-a putut observa variația semnificativă între loturile experimentale, în ceea ce privește numărul de celule prezent în girusul dentat. Colorație H&E, x400, scala = 10 μ m.

6.3.1. Discuții

Examinarea histologică a ficatului nu a evidențiat modificări morfo-structurale semnificative la cele șase loturi experimentale, comparativ cu lotul Control. Aspectele histologice ale morfologiei hepatice, observate la lotul S, expus stresului de imobilizare și ilustrate prin distrofia clară, moderată, a hepatocitelor, asociate cu dilatarea lumenului capilarelor sinusoidale, sunt modificări reversibile și temporare (Rostamkhani și colab., 2012; Kumar și colab., 2013). Administrarea extractelor vegetale de *L. album*, respectiv *L. purpureum* (lotul LA și lotul LP), nu a avut efecte toxice asupra structurii hepatice, aspectul histologic general al ficatului fiind foarte apropiat de cel al lotului de control. Examinarea histologică a secțiunilor de ficat, la loturile SLA și SLP, expuse stresului anakinetic și tratate concomitent cu cele două extracte vegetale de *L. album*, respectiv *L. purpureum*, de asemenea, nu a evidențiat modificări morfologice semnificative ale parenchimului hepatic, comparativ cu lotul Control. Aceste observații au sugerat un efect protector al celor două extracte vegetale, în condițiile expunerii animalelor la stres. Aceste rezultate au susținut datele experimentale ale lui Matkowski și Piotrowska (2006), care menționau efectul benefic și protector poliorganic al extractelor din genul *Lamium* (Roman și colab., 2016; 2017).

Analiza rezultatelor experimentale, privind efectele asupra structurii rinichiului ale expunerii subcronice a animalelor la stresul de imobilizare, a relevat existența unor leziuni minore, atât la nivelul porțiunii proximale și distale a tubilor uriniferi, cât și la nivelul corpusculilor Malpighi. Considerăm că aceste leziuni minore au caracter reversibil, având în vedere potențialul regenerator al membranei bazale care susține epiteliul tubilor uriniferi (Houghton și colab., 1976). Rezultatele noastre au fost în acord cu datele prezentate de Demirci și Ozbek (2009), care au observat că stresul are efecte negative asupra structurii rinichiului la șobolani. Administrarea extractului de *L. album* (lotul LA) a avut ca efect dilatarea lumenului tubilor uriniferi, atât pe

porțiunea proximală, cât și distală a acestora, modificările nefiind însoțite de descuamări epiteliale. La nivel glomerular, s-au observat dilatări moderate ale spațiilor intermezangiale însoțite de proliferarea celulelor mezangiale și endoteliale, situație care sugerează efectul diuretic al extractului. La examinarea histologică a parenchimului renal la lotul LP, tratat cu extract de *L. purpureum*, aspectul morfologic general al parenchimului renal a fost apropiat de cel al lotului Control. Porțiunea proximală a tubilor contorți a prezentat dilatări moderate ale lumenului acestora, fără caracter patologic. Aceste observații sugerează că extractul de *L. purpureum* a avut un efect diuretic mai redus. Rezultatele investigațiilor structurale ale rinichiului la lotul SLA, expus stresului anakinet și tratat concomitent cu extract vegetal de *Lamium album*, a evidențiat fenomene de dilatare mai intensă, pe arii mai extinse, atât ale lumenului tubilor uriniferi, cât și a spațiilor intercapilare intraglomerulare din corticala renală. La lotul SLP, expus stresului de imobilizare și tratat concomitent cu extract de *L. purpureum*, nu s-au înregistrat modificări semnificative ale structurii parenchimului renal, comparativ cu Controlul, acest fapt demonstrând atât un efect protector față de efectul advers al stresului, cât și un potențial diuretic mai redus al extractului vegetal de *L. purpureum*.

În privința glandelor suprarenale, aspectul morfologic al acestora, la lotul S, a sugerat o activitate secretorie crescută a suprarenalelor în condițiile de stres experimentale. Rezultatele noastre au fost în concordanță cu datele obținute de Sapolsky și colab. (2000), care au observat că, în funcție de intensitatea și de perioada expunerii la diferiți factori stresori, aceștia pot avea atât efecte stimulative, de mediere, cât și supresoare a secreției hormonilor glucocorticoizi la nivelul glandei suprarenale. Administrarea extractului de *L. album* la lotul LA, precum și a extractului de *L. purpureum* la animalele lotului LP, a indus unele modificări morfologice, îndeosebi la nivelul zonei fasciculate a suprarenalelor, unde celulele orientate în cordoane paralele, nu au mai prezentat aspectul normal, spongicitar, caracteristic. La lotul LP, în zona fasciculată, s-a remarcat un cordon de celule cu citoplasma inactivă,

compactă și închisă la culoare (*dark cells*). Toate aceste aspecte au sugerat o inhibare a secreției hormonilor glucocorticoizi, mai accentuată la lotul LP, comparativ cu Controlul. Analiza studiului histologic al suprarenalei, la loturile SLA și SLP expuse stresului de imobilizare și tratate concomitent cu extractul de *L. album*, respectiv *L. purpureum*, a relevat prezența de grupări mari de spongicele cu aspect compact, închise la culoare, cu citoplasma lipsită de incluziuni lipidice. Modificările morfostructurale au fost asociate cu o scădere semnificativă a concentrației de colesterol din suprarenală, la ambele loturi experimentale, după cum și Savchenko și colab. (2001), Paduch și colab. (2007) și Spencer și colab. (2004) au demonstrat, în cercetările lor privind acțiunea *in vivo* a diferitelor forme fitofarmaceutice cu *Lamium*.

Ca organ central al sistemului imunitar, timusul reprezintă colectorul primar de țesut limfoid din care se livrează limfocite în ganglionii limfatici, în splină și alte organe ale limfocitopoiezei (Cooper și colab., 1967; Griesemer și colab., 2010). Expunerea animalelor la stresul de imobilizare (lotul S) a avut, ca prim efect, îngroșarea corticalei, comparativ cu Controlul, care a sugerat o stimulare a proliferării timocitelor. Administrarea extractului vegetal de *L. album*, la lotul LA, a determinat hiperplazia semnificativă a zonei corticale, efect care ar putea fi asociat, de asemenea, cu stimularea proliferării timocitelor T imature, după cum au demonstrat în studii similare Sanchez de Medina și Zarzuelo, 2008; Szajdek și Borowska, 2008; și Cuevas și colab., 2013. La lotul LP, s-a presupus o proliferare mai accentuată a limfocitelor din zona medulară, pe baza aspectului histologic observat. La lotul SLA, aspectul general al morfologiei timusului a fost caracterizat prin reducerea moderată a grosimii corticalei și a medularei, drept consecință a hipoplaziei populațiilor celulare atât din corticală, cât și din medulară. În cazul grupului SLP, s-a constatat o îngroșare mai accentuată a medularei, asociată unei hiperplazii moderate a limfoblastelor din această zonă.

La nivel cerebral, activitatea specifică a extractului de *L. album* a fost demonstrată prin legătură dintre iridoide din *L. album* (SME, ASME) și

receptorii pentru GLP-1 (glucagon-like peptide 1), exprimați în hipocamp, hipotalamus, corpi striati, cortex cerebelos și neocortex (Larsen și colab., 1997; Cork și colab., 2015). Administrarea extractului a avut efecte antioxidante (scăderea TBARS și CAT din hipocamp, respectiv sânge), antiinflamatorii (scăderea TNF α din hipocamp) și reglatoare ale axei HHHS (scăderea corticosteronului și a adrenalinei). Datele obținute au fost în concordanță cu alte cercetări (Madrigal și colab., 2001; Şahin și Gümüşlü, 2004; 2007; Buynitsky și Mostofsky, 2009) care au demonstrat efectele prooxidante, proinflamatorii și stimulative asupra axei HHHS, ale stresului de imobilizare. Totodată, Grundman și colab. (2010) au arătat acțiunea reglatoare și modulatorie a polifenolilor sau iridoidelor asupra reacției oxidative, inflamatorii și asupra reactivității sistemului neuro-endocrin. S-a observat, totodată, că stresul de imobilizare a determinat apariția unor modificări de tip glioză, la nivelul zonei subgranulare a girusului dentat, cu expansiuni în neuronii granulari ai aceleași substructuri a formațiunii hipocampice. Mai mult, administrarea extractului nu doar că a contracarat efectele stresului, dar a condus la proliferarea stratului granular al girusului dentat și la expansiunea formațiunii, modificări care au sugerat o posibilă stimulare a neurogenezi adulte (asupra acestui subiect se derulează cercetări în cadrul colectivului nostru). În urma cercetării bibliografice, s-a ajuns la concluzia că receptorii pentru GLP-1 sunt implicați direct în plasticitatea straturilor neuronale ale girusului dentat (Lachey și colab., 2005; Cork și colab., 2015). În plus, iridoidele prezente în *L. album*, precum SME și ASME, au fost descrise ca molecule agonist pentru receptorii GLP-1 (Ghosal și colab., 2013; Holt și Trapp, 2016). Pe baza acestor observații, s-a conturat ipoteza implicării directe a SME/ASME în procesul regenerativ celular asociat tratamentului cu *L. album*. Polifenolii și alți fitocompuși (alături de iridoidele SME și ASME) au fost responsabili de efectul antioxidant și antiinflamator al extractului din *L. album*.

6.3.2. Concluzii

Testarea pe șobolanul de laborator a extractelor de *L. album* și *L. purpureum*, în condiții normale și de stres de imobilizare, a relevat multiple bioactivități de ordin protector și reglator ale acestora. Pe de altă parte, modelul biologic folosit a scos în evidență ordinea intrării în reacția defensivă a biosistemului model (șobolanul alb Wistar) prin intermediul reacțiilor adaptative (i) biochimice și (ii) tisulare. Modelul biologic a arătat, de asemenea, că organele asociate axei funcționale HHHS sunt în prima linie de reacție adaptativă, urmate de organele cu rol principal metabolic (ficat, rinichi). S-a putut observa bioactivitatea specifică a extractului de *L. album*, fundamentată pe prezența în extract a unor iridoide precum SME și ASME. Aceste iridoide au fost responsabile și de efectele regenerative ale extractului de *L. album* asupra girusului dentat.

6.4. Compoziție chimică și acțiunea protectivă asupra ficatului și rinichiului, a extractului de *Vaccinium vitis-idaea* L., după expunerea cronică a șobolanului Wistar la etanol

Pentru realizarea extractelor din fructe de merișor s-au utilizat fructe proaspete, recoltate de la Muntele Băișorii (jud. Cluj). Fructele proaspete (500 g) au fost mărunțite și introduse într-un recipient de 1000 mL, peste care s-a adăugat alcool etilic 96% (250 ml), până la calcularea procentului de umiditate al fructelor proaspete, după care recipientul s-a închis ermetic. După determinarea conținutului de apă (cca. 3 ore), s-a adăugat diferența de etanol, astfel încât volumul de alcool etilic 96% să fie egal cu cel al conținutului de apă din fructe. S-a determinat, astfel, un conținut de apă de 86,3 %, adăugându-se încă 181,5 ml alcool, în total 431,5 mL etanol pentru 500 g fructe. Vasul cu fructele mărunțite și cu alcool s-a lăsat la macerat, timp de 14 zile, la întuneric, la temperatură de < 20° C, agitând zilnic de 3 ori, după care s-a filtrat. S-au obținut astfel, 500 mL extract hidroalcoolic în raport solvent/fructe de 1:1, ceea ce a însemnat că 1 mL de extract a corespuns la 1 g de fructe proaspete. Asupra acestui

extract au fost efectuate observații și determinări organoleptice și fizico-chimice, prezentate în **Tabelul 20** (Roman și colab., 2014).

Tabelul 20. Caractere fizico-chimice și conținutul de acid benzoic al extractului de *Vaccinium vitis-idaea*

Caracteristici	Parametri
Aspect	lichid limpede
Culoare	roșu-vișiniu
Gust	ușor amărui
Densitate	0.9627
Reziduu prin evaporare (g/g %)	7.14 ± 0.46 %
Conținut în alcool	45%
Identificarea acidului benzoic	cromatografie în strat subțire
Conținut în acid benzoic	40 ± 0.06 mg %

Bioactivitatea extractului din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*, în contextul ficatului și rinichiului alcoolic a fost evaluată prin prisma parametrilor biochimici determinați din sânge (**Tabelul 21**) (Roman și colab., 2014) și pe baza examenului histologic al ficatului (**Fig. 29**), respectiv a rinichiului (**Fig. 30**). Rezultatele obținute, în urma determinărilor nivelului glicemiei, colesterolului seric, transaminazelor serice (GOT și GPT) precum și ale ureei și creatininei serice, sunt redată în **Tabelul 21**. În urma tratamentelor aplicate, s-a constatat că, la nivelul glicemiei nu au avut loc modificări semnificative ale valorilor, iar colesterolul seric a scăzut semnificativ doar la lotul intoxicat cu alcool (A) ($p < 0.05$), față de lotul de Control (C). Transaminazele serice s-au modificat semnificativ în cazul GPT, care a crescut ($p < 0.05$) la lotul intoxicat cu alcool (A) și la cel intoxicat cu alcool și tratat cu extract de merișor (AE) ($p < 0.001$), comparativ cu Controlul. La nivelul GOT, nu s-au observat modificări semnificative ale valorilor comparativ cu lotul Control. Valorile ureei și ale creatininei serice nu au prezentat modificări semnificative la lotul tratat cu extract de merișor (E), în schimb, la loturile A și AE, valorile celor doi parametri s-au modificat semnificativ: la lotul A nivelul ureei a scăzut ($p < 0.01$) și creatinina serică a crescut ($p < 0.05$), iar la lotul AE, ureea a scăzut ($p < 0.01$) și creatinina serică a crescut ($p < 0.05$), în comparație cu lotul Control.

Tabelul 21. Valorile parametrilor biochimici sanguini la Control și la grupurile experimentale. C -Control; E – Extract din *V. vitis-idaea*; A – alcool etilic; AE – Alcool etilic + Extract din *V. vitis-idaea*. Valorile sunt exprimate ca medie (m) ± SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

	C	E	A	AE
GLUC (mg/dL)				
m ± SD	140.33 ± 5.17	143.66 ± 4.13	138.66 ± 9.04	129.66 ± 3.86
CHOL (mg %)				
m ± SD	111.17 ± 5.92	99.82 ± 8.02	89.34 ± 6.85*	104.20 ± 6.65
GOT (μg pyr/mL)				
m ± SD	745.56 ± 46.47	750.93 ± 19.44	739.63 ± 31.06	747.67 ± 11.53
GPT (μg pyr/mL)				
m ± SD	216.9 ± 25.18	197.98 ± 17.79	341.1 ± 48.83*	396.9 ± 33.4***
UREA (mg/dL)				
m ± SD	51.35 ± 2.35	51.72 ± 2.49	40.61 ± 0.59**	40.57 ± 1.15**
CREA (mg/dL)				
m ± SD	0.39 ± 0.064	0.37 ± 0.056	0.54 ± 0.06*	0.47 ± 0.056*

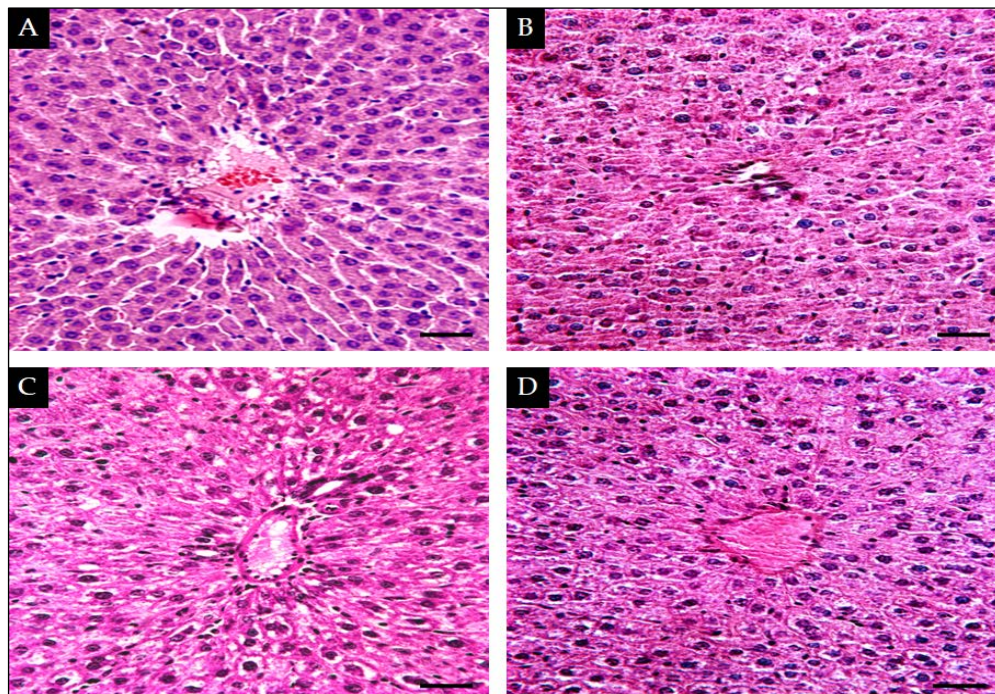


Fig. 29. Aspectul histologic al ficatului la lotul Control (A), Extract (B), Alcool (C) și Alcool + Extract (D). Col. HE, x400, scala = 25 μm.

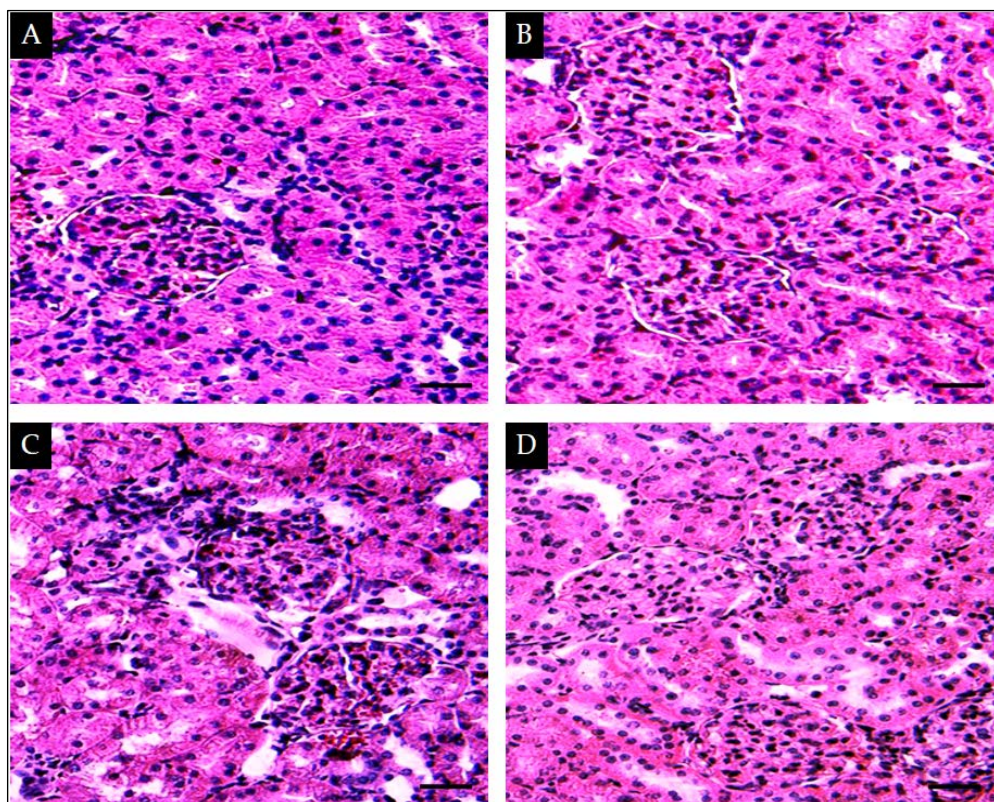


Fig. 30. Aspectul histologic al rinichiului la lotul Control (A), Extract (B), Alcool (C) și Alcool + Extract (D). Col. HE, x400, scala = 25 μ m.

Examinarea secțiunilor din ficat, la lotul Control (**Fig. 29A**), a relevat aspectul normal, caracteristic al structurii hepatice. Administrarea extractului hidroalcoolic de *V. vitis-idea* (lotul E, **Fig. 29B**) nu a indus modificări ale structurii ficatului, imaginile histologice fiind asemănătoare celor de la lotul de Control. Tratarea animalelor cu alcool etilic (lotul A, **Fig. 29C**) a determinat modificări morfologice ale parenchimului hepatic, caracterizate prin dilatări ale capilarelor sinusoide, hiperplazia hepatocitelor, distrofia clară și granulară a acestora, care în zonele pericentrolobulare a prezentat aspecte de încărcare grasă discretă, sugerată de prezența unor spații clare perfect rotunde, de diferite dimensiuni, situate intra și pericelular. La unele hepatocite s-au remarcat anizocarii sau nucleii hipertrofici, alături de celule cu nucleii picnotici. Aceste modificări au fost asociate cu mici focare infiltrative cu elemente celulare dispuse perivascular. La acestea s-au adăugat

unele celule necrotice situate centrolobular. La lotul AE (**Fig. 29D**), tratat cu alcool etilic asociat cu extractul vegetal de merișor, au fost evidențiate modificări histologice importante ale parenchimului hepatic, caracterizate, în general, prin distrofia clară și pe alocuri granulară a hepatocitelor, prezența de spații clare, perfect rotunde situate intra și pericelular, toate aceste modificări localizate cu predilecție în aria pericentrală a lobulului hepatic. Unele hepatocite precum și unele celule Kupffer au fost balonizate; alte hepatocite au fost hipertrofiate, având un conținut citoplasmatic redus sau complet lipsite de conținut celular, nucleii picnotici fiind situați excentric. S-au mai remarcat mici focare necrotice centrolobulară, hepatocitele fiind delimitate de infiltrate inflamatorii.

Sub aspectul funcției renale (**Fig. 30**), extractul de *V. vitis-idea* a determinat amplificarea proceselor lezionale induse de etanol. La lotul E (**Fig. 30B**), tratat cu extractul vegetal de merișor, nu s-au semnalat modificări morfo-structurale ale rinichiului, aspectul histologic general fiind asemănător lotului Control (**Fig. 30A**). Tratamentul subcronic al animalelor cu alcool etilic (lotul A, **Fig. 30C**) a determinat dilatarea accentuată a lumenului tubilor uriniferi. Epiteliul acestora a prezentat aspecte de distrofie vacuolară tubulară, respectiv degenerescență granulo-vacuolară, asociată cu prezența de infiltrate cu elemente sanguine, cele mai afectate componente ale nefronului fiind tubul proximal și porțiunea sa distală, situate în zona corticală. O parte a tubilor contorți proximali și distali au prezentat epiteliu crescute în volum precum și descuamări epiteliale. La nivelul glomerulilor, s-au constatat leziuni caracterizate printr-o discretă îngroșare a anșelor capilare glomerulare asociate cu dilatări ale spațiilor interglomerulare. Alcoolul având și efect vasodilatator, a determinat dilatarea lumenului vaselor sangvine. La lotul AE (**Fig. 30D**), ca urmare a administrării extractului de merișor asociat cu alcool etilic, s-a constatat o atenuare a aspectelor distrofice tubulare induse de alcoolul etilic. În unele zone ale corticalei, au mai fost observate totuși, porțiuni tubulare incluzând fenomene de vacuolizare și descuamări ale epiteliilor tubilor uriniferi, însă, prin coroborarea datelor histologice cu cele biochimice (uree, creatinină), extractul a determinat amplificarea disfuncției renale indusă de etanol (Roman și colab., 2014).

6.4.1. Discuții

Administrarea preparatului de merișor, în cazul hipermenoreei, poate înjumătăți durata ciclului menstrual și reduce stările de slăbiciune, anemie, devitalizare, după cum au demonstrat Oszmiański și colab., (2016), Ren și colab. (2017) sau Prokop și colab. (2019). Tinctura de merișor, cu efecte ușor hipoglicemiente, ajută la stabilizarea glicemiei și este benefică în menținerea stabilității metabolice, la pacienții cu diabet zaharat de tip I sau II. În plus, frunzele de merișor previn apariția complicațiilor cardiovasculare ale diabetului (Koshova, 2015; Huang și colab., 2018; Zagayko și colab., 2014). Datorită efectului antioxidant puternic, merișorul împiedică depunerea lipidelor pe vasele de sânge și formarea plăcilor de aterom (Kianbakht și colab., 2016), având, astfel, indicații ca adjuvant în hipertensiunea arterială sau la pacienții cu tablou lipidic specific steatohepatitei cu etiologie multiplă (Peixoto și colab., 2018). Cu toate acestea, în raport cu bioactivitatea unui extract vegetal, foarte rar se menționează spectrul de contraindicații ale acestuia. Datele noastre au demonstrat, în acest caz, efectul nefavorabil al extractului din fructe de merișor asupra ficatului și rinichiului expuși cronic la alcool etilic.

Multitudinea de indicații pe care extractul din fructe de merișor le deține, după o serie de cercetări amănunțite, presupunem noi, s-ar împuțina, întrucât multe efecte ale unui extract au fost de-a lungul timpului extrapolate din compoziția acestuia, iar cercetări *in vivo* ulterioare, în cadrul unor patologii induse, au demonstrat ineficiența sau toxicitatea aceluia preparat.

6.4.2. Concluzii

În cazul testelor *in vivo*, pentru conturarea bioactivității specifice, extractul din fructe de merișor a semnalat o reacție atipică, în fitoterapie, însă esențială: un preparat fitofarmaceutic nu a avut efecte pozitive asupra anumitor organe și indicatori biochimici. Modelul biologic al steatohepatitei etanolice și a nefrotoxicității nespecifice a alcoolului etilic, la șobolanul alb

din rasa Wistar, au evidențiat pleiomorfismul unui model biologic indus de un singur factor, în cazul nostru, etanolul. Totodată, s-au putut remarca atât efecte benefice pe alocuri, cât și nefavorabile, ale extractului din fructe de *V. vitis-idea* asupra ficatului și rinichiului expuse cronic la alcoolul etilic.

6.5. Acțiunea extractului de *Galium verum* L., asupra axei hipotalamus – hipofiză – glande suprarenale în condiții de stres de imobilizare

Studiul activității neurosecretoare hipotalamice la lotul Control (**Fig. 31A**) a permis evidențierea unei activități neurosecretoare normale atât în pericarionul neuronal la nivelul neuronilor magnocelulari și parvocelulari din nucleul paraventricular hipotalamic (NPV), cât și de-a lungul prelungirilor axonale, aspecte similare ale morfologiei neuronale fiind întâlnite și în zonele parvocelulare ale ariei periventriculare hipotalamice (Roman și colab., 2015). Alături de neuroni cu pericarionul abundent în produși de neurosecreție, s-au remarcat și neuroni cu o activitate neurosecretoare mai redusă. Expunerea animalelor timp de 15 zile la stres de imobilizare (lotul S, **Fig. 31B**) a indus scăderea neurosecrețiilor în zonele magno și parvocelulare hipotalamice. Alături de aceștia, au fost observați neuroni cu nuclei picnotici și citoplasma condensată. Unii neuroni au fost hipertrofiați, cu citoplasma vacuolizată. Administrarea extractului hidroalcoolic de *G. verum* (lotul E, **Fig. 31C**) a determinat manifestarea unei activități neurosecretorii moderate spre normal, la aproximativ 75% din neuronii magnocelulari, precum și la cei din ariile parvocelulare ale NPV. Aproximativ 25% din neuronii magno și parvocelulari au fost intens activi. La animalele care au fost tratate cu extract de *Galium verum* și supuse stresului de imobilizare (lotul ES, **Fig. 31D**), s-a evidențiat o accentuare a activității neurosecretoare atât în aria magnocelulară, cât și în cea parvocelulară a NPV. Studiul histologic al adenohipofizei la lotul Control (**Fig. 32A**), a evidențiat aspectul normal al glandei, cu o distribuție caracteristică specifică a tipurilor celulare acidofile, bazofile și cromofobe. Expunerea animalelor, la stresul de imobilizare (lotul S, **Fig. 32B**), a indus modificări semnificative ale aspectului

glandei, caracterizate printr-un bazofilism crescut, asociat cu o celularitate scăzută a adenohipofizei. S-a remarcat, totodată, hipoplazia moderată a celulelor acidofile α , situate în zonele laterale ale glandei. Unele celule (atât acidofile, cât și bazofile) au fost hipertrofiate, cu un volum celular crescut. Citoplasma, la aceste celule, a fost balonizată, conținând vacuole clare de mici dimensiuni. O parte din celulele bazofile au fost distrofice, cu nucleu picnotic, alte celule, de formă rotundă sau alungită, fiind hipertrofiate, intens vacuolizate, cu nucleul situat excentric (așa numitele celule Crooke – caracteristice stărilor de stres), printre celule remarcându-se spații clare, de diferite dimensiuni sau proliferări de țesut conjunctiv. Capilarele sinusoide au prezentat dilatări accentuate. Administrarea extractului de *G. verum* (lotul E, **Fig. 32C**) a indus modificări morfopatologice, de anvergură mai redusă, caracterizate printr-un bazofilism ușor crescut, asociat și unei intensificări moderate a caracterului acidofil al glandei. S-a mai remarcat prezența de spații intercelulare cu aspect spumos, cu conținut acidofil, asociate cu dilatări ale lumenului capilarelor. Tratamentul cu extract de *G. verum*, urmat de expunerea animalelor la stresul de imobilizare repetată (lotul ES) a determinat o creștere semnificativă, atât a caracterului acidofil, cât și a celui bazofil al adenohipofizei. S-a observat, totodată, acumularea compușilor de secreție în citoplasma celulelor acidofile și bazofile. În parenchimul glandular au apărut spații pericelulare mult dilatate, vacuolizate, pline cu conținut acidofil, remarcându-se totodată și dispariția în totalitate a celulelor Crooke (**Fig. 32D**) (Roman și colab., 2015).

Modificările morfologice observate la nivelul hipotalamusului și adenohipofizei, în condițiile experimentale date, au determinat o reactivitate diferită a suprarenalelor în raport cu lotul Control (**Fig. 33A**). Astfel, la lotul S (**Fig. 33B**) s-a remarcat o îngroșare moderată a corticalei, îndeosebi a zonei fasciculate, asociată cu o diminuare a ariei medulosuprarenalei, raportul zonă corticală/zonă medulară, fiind ușor în favoarea corticalei. În zona fasciculată s-a observat deranjarea dispunerii în cordoane paralele a celulelor. La limita dintre zona fasciculată și cea glomerulară, unele spongiciote au fost cu nucleii hipertrofiați. Printre cordoanele celulare spongicitare s-au intercalat grupări

mari, formate din celule inactive, cu aspect compact, întunecate (așa numitele *dark cells*), caracteristice stărilor de stres. Administrarea extractului de *G. verum* (lotul E, **Fig. 33C**) nu a indus modificări semnificative ale morfologiei suprarenalelor. În schimb, administrarea extractului de *G. verum*, la animalele expuse stresului (lotul ES, **Fig. 33D**), a indus modificări esențiale ale morfologiei glandelor suprarenale, caracterizate în primul rând, printr-o îngroșare a corticalei. În zona fasciculată, celulele orientate în cordoane paralele, nu au mai prezentat aspectul normal spongiositar. În al doilea rând, majoritatea celulelor au avut citoplasma lipsită de incluziuni lipidice, cu nucleu sferic bine delimitat. Medulosuprarenala a fost bine dezvoltată, cu cordoane celulare delimitate de spații largi, în care țesutul conjunctiv a înglobat capilarele sinusoidale intens dilatate (Roman și colab., 2015).

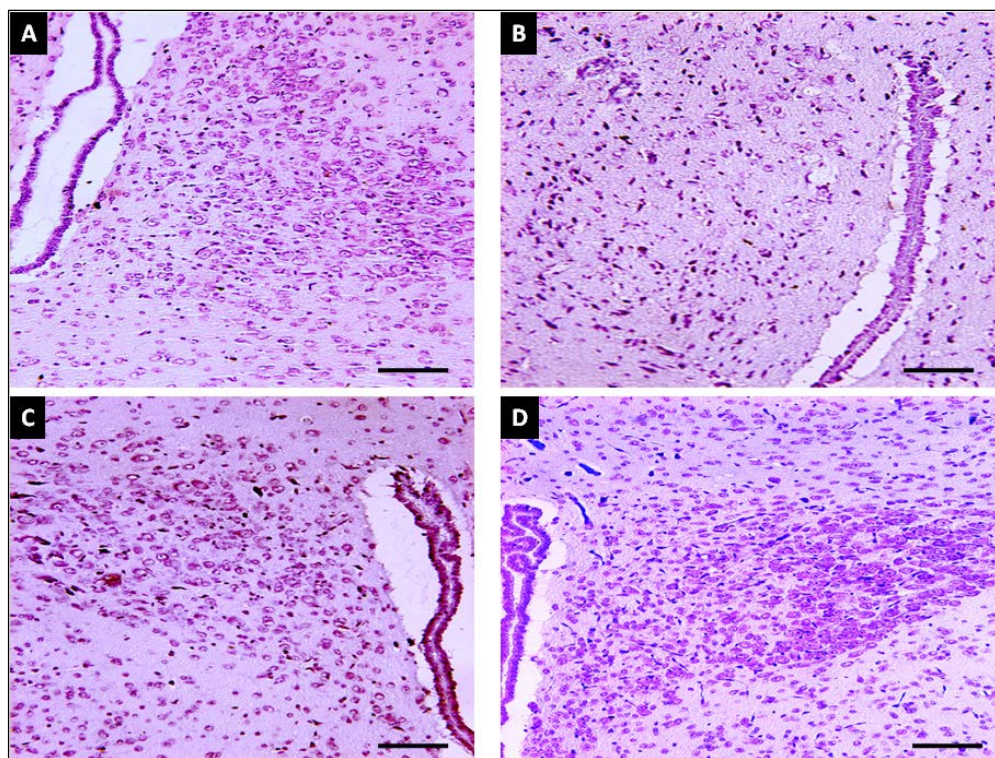


Fig. 31. Activitatea neurosecretorie a nucleului paraventricular la lotul Control (A), Stres (B), la grupul tratat cu extract de *G. verum* (B) și la animalele expuse stresului și tratate cu extract de *G. verrum* (D). Col. Nissl, x200, scala = 50 μm.

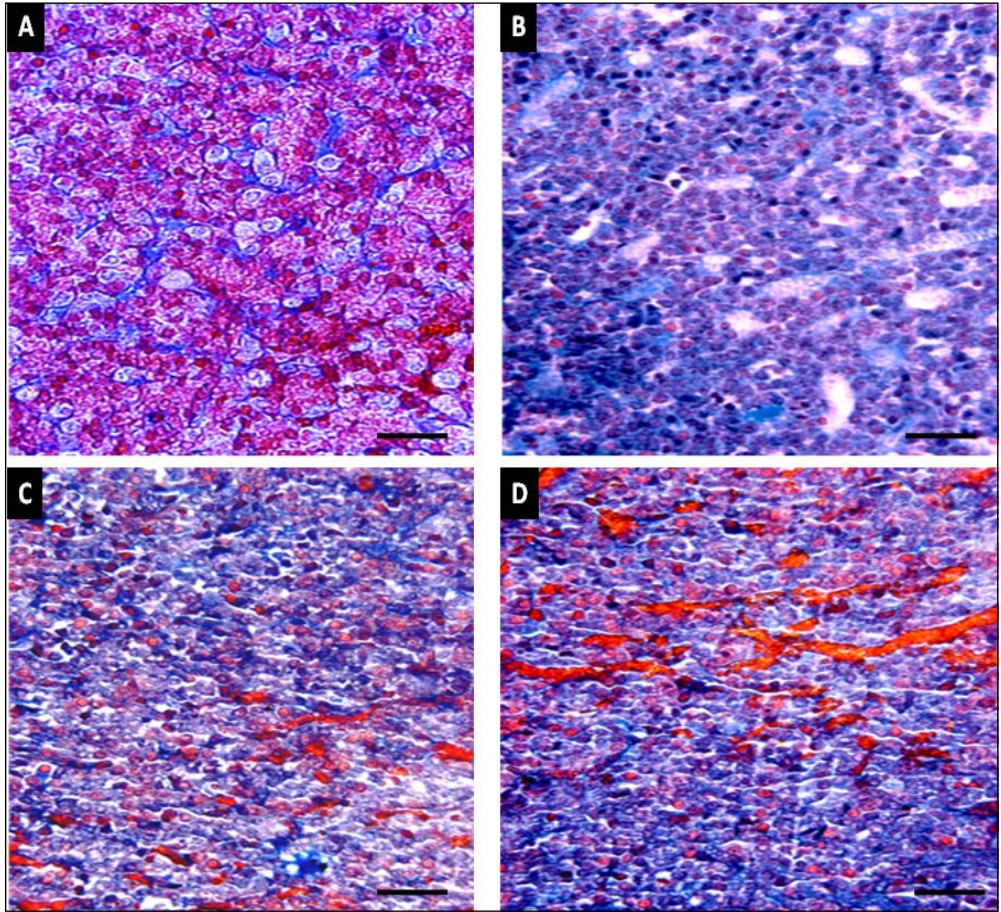


Fig. 32. Structura adenohipofizei la Control (A) și grupurile experimentale: Stres (B), tratament cu *G. verum* (C) și la animalele expuse stresului și tratate cu extract de *G. verrum* (D). Col. Hurdac, x400, scala = 25 μ m.

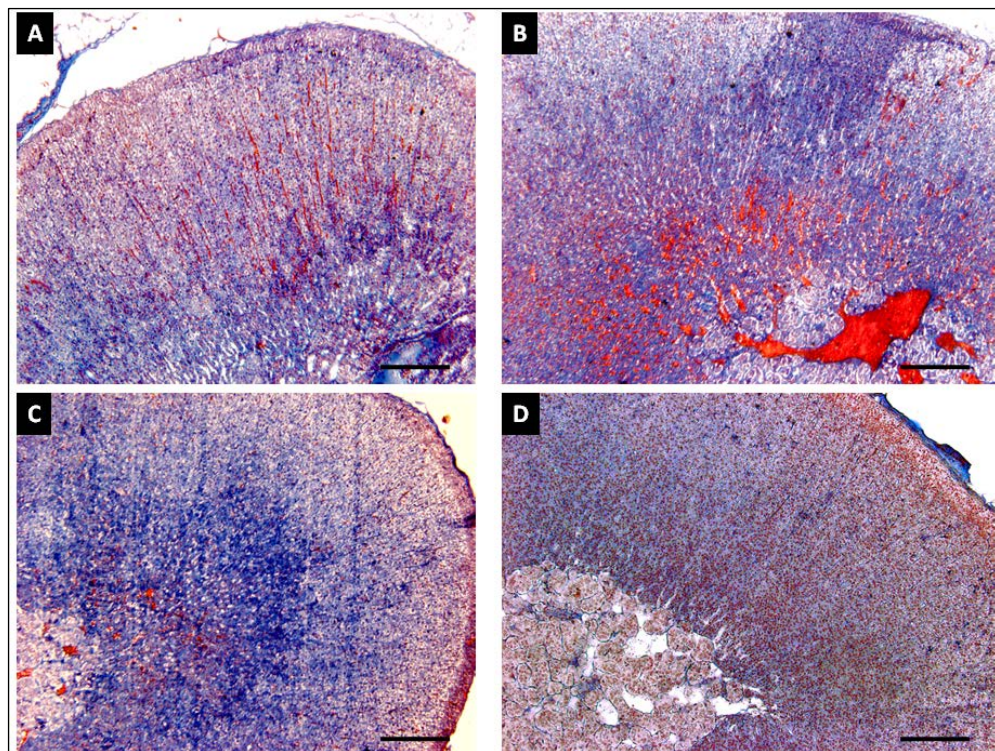


Fig. 33. Structura glandei suprarenale la Control (A) și la grupurile experimentale: Stres (B), tratament cu *G. verum* (C) și la indivizii expuși stresului și tratați cu extract de *G. verum* (D). Col. HE, x100, scala = 100 μ m.

6.5.1. Discuții

În ceea ce privește evaluarea activității neurosecretorii hipotalamice, rezultatele experimentului nostru au relevat că, expunerea subcronic a animalelor la stres de imobilizare, a determinat diminuarea moderată a produșilor de neurosecreție din pericarionul neuronal, atât în aria magnocelulară, cât și în cea parvocelulară a NPV, iar granulele de neurosecreție au fost acumulate îndeosebi în corpii axonali. Aceste aspecte au sugerat diminuarea secreției de CRH hipotalamic după cum menționau Kivalo și Rinne (1960), numărându-se printre lucrările inedite care au studiat histofiziologia nucleilor hipotalamici. Administrarea extractului de *G.verum* nu a influențat semnificativ activitatea neurosecretorie din

NPV. Consecutiv tratării animalelor (lotul ES) cu extractul vegetal și a expunerii la stres, s-a observat o intensificare a activității neurosecretorii în NPV, ceea ce sugerează o eliberare crescută de neuropeptide hipotalamice după cum a menționat Galoyan în numeroase lucrări (Galoyan, 2000; 2004; 2012). Activitatea neurosecretorie, evidențiată prin colorația Nissl, reprezintă întreaga gamă de neuropeptide (neurohormoni, substanța P, encefaline etc.), secretate la nivelul nucleilor hipotalamici. Studiul histologic al adenohipofizei a evidențiat că expunerea animalelor la stres a determinat creșterea bazofilismului celular asociat cu o celularitate (populație de celule/secțiune) mai scăzută a adenohipofizei. Unele celule au fost hipertrofiate, intens vacuolizate, cu nucleii situați excentric (celule Crooke). Aceste aspecte sugerează o diminuare a secreției hormonilor adenohipofizari după acum au arătat diferite studii (Crooke, 1935; Adams și Perase, 1959; Uei, 1988). Administrarea extractului de *G. verum*, asociată expunerii animalelor la stres, a determinat o creștere semnificativă a caracterului acidofil și bazofil al adenohipofizei, manifestat prin acumularea compușilor de secreție în citoplasma celulelor acidofile și bazofile. S-a remarcat, de asemenea, dispariția în totalitate a celulelor Crooke. Imaginea structurală a adenohipofizei sugerează că administrarea extractului vegetal în condiții de stres neuropsihic (ca model biologic fiind stresul de imobilizare) a avut ca efect intensificarea secreției hormonilor adenohipofizari. Studiul histologic al glandelor suprarenale a relevat reactivitatea morfologică diferită a glandei în funcție de situația experimentală a animalelor, în comparație cu lotul Control. Structura suprarenalei, la lotul S a fost caracteristică celei întâlnite în situații de stres, remarcându-se în special, deranjarea dispunerii în cordoane paralele a celulelor (Gilbey și Spyer, 1993; Kajiwarra și colab., 1997; Moroz și colab., 2018). Aspectul general al glandei a sugerat o activitate secretorie a hormonilor glucocorticoizi mai redusă. Administrarea extractului de *Galium verum*, la lotul E, nu a indus modificări semnificative ale morfologiei suprarenalelor. La lotul ES, modificările morfologice

înregistrate la nivelul stratului glomerular și fasciculat al corticalei au sugerat o activitate intensă a sintezei și secreției hormonilor mineralcorticoizi și glucocorticoizi (Roman și colab., 2015).

6.5.2. Concluzii

Datele experimentale, ancorate în contextul experimental, au demonstrat că, modelul biologic utilizat pe șobolanul alb din rasa Wistar poate evidenția noi mecanisme fundamentale de acțiune a unui complex de fitocompuși (extractul vegetal). S-a remarcat efectul sinergic al extractului cu cel al stresului în sensul stimulării glandelor suprarenale. Per ansamblu, rezultatele studiului histologic al axei hipotalamus – adenohipofiză – glande suprarenale au demonstrat că administrarea extractului de *G. verum*, în condițiile expunerii animalelor la stres de imobilizare, a indus modificări morfologice importante la nivelul întregului ansamblu constitutiv al axei hipotalamo-hipofizo-suprarenaliene, rezultate pledând în favoarea stimulării activității secretorii a acesteia.

6.6. Efectul extractului de *Malus sylvestris* Mill. asupra ficatului steatotic și corelații cu reacția inflamatorie

Ficatul este considerat cel mai afectat organ de toxicitatea xenobioticelor, aflându-se la intersecția dintre absorbție și circulația sistemică, fiind unul din organele principale pentru transformarea și eliminarea medicamentelor sau a altor compuși chimici (de la solvenți organici până la peptide) (Russmann și colab., 2009; Dey și colab., 2013). Expunerea ficatului la tetracolorura de carbon, pe de o parte reflectă interese foarte vechi ale cercetării în domeniul hepatologiei (Pandit și colab., 2012), iar pe de altă parte mimează fenomene precum inflamație, steatohepatită, ciroză de natură medicamentoasă, fibroză hepatică, distrofie grasă sau colestează. Aceste patologii vor fi, întotdeauna, însoțite de puternice debalansări redox, generate de acțiunea radicalului

triclormetil, rezultat în urma metabolizării oxidative a tetraclorurii de carbon (Bishayi și colab., 2002; Masuda, 2006; Sun și colab., 2010; Dong și colab., 2016).

Administrarea CCl_4 , ca orice alt model biologic, trebuie văzută ca o modalitate de a obține un context patologic, în cadrul căruia să se deruleze cercetări, în acest caz, cu privire la terapii antiinflamatoare, efecte ale unor compuși antisteatotici sau a unor compuși hepatoprotectivi.

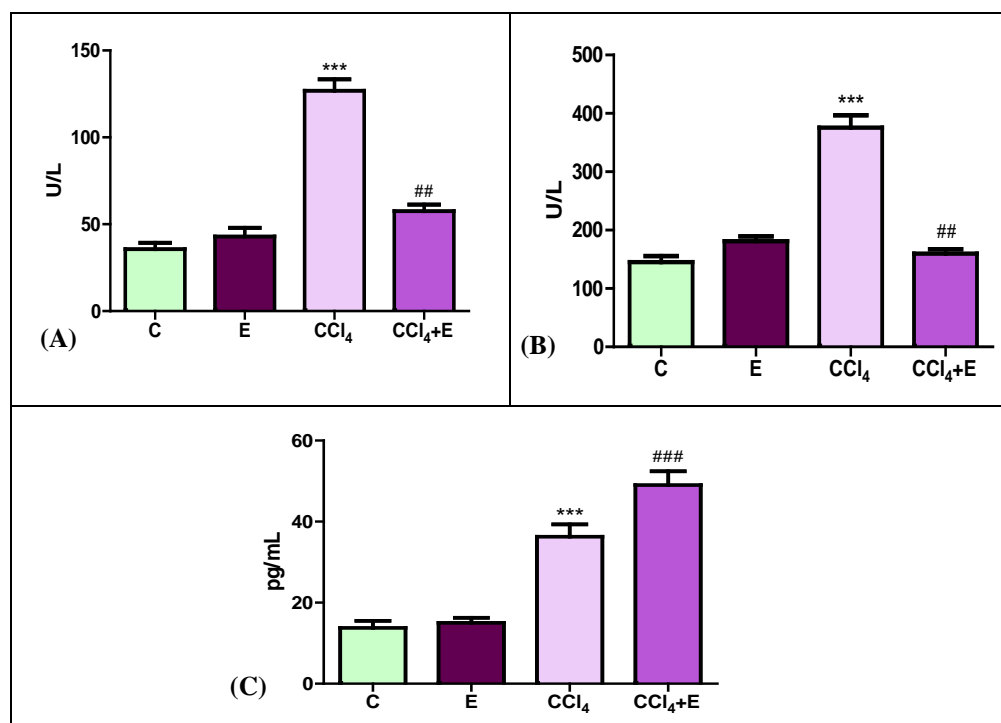


Fig. 34. Valorile ALT (A), AST (B) și $\text{TNF}\alpha$ (C), la Control și la grupurile experimentale, în urma administrării CCl_4 respectiv a extractului de *M. sylvestris* + CCl_4 . Valorile sunt exprimate ca medie \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

În urma administrării tetraclorurii de carbon, transaminazele ALT (Fig. 34A) și AST (Fig. 34B), precum și $\text{TNF}\alpha$ (Fig. 34C) din sânge, au crescut. Răspunsul imun mediat celular prin limfocite (Fig. 35A) și în termeni generali, prin leucocitele totale (Fig. 35B), a fost amplificat de procesele lezionale hepatice, pe care CCl_4 le-a indus (Fig. 36) (Toma și colab., 2018).

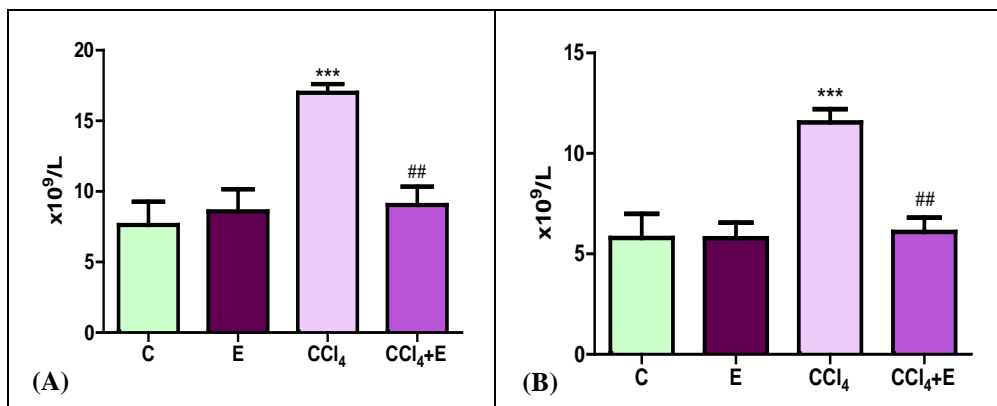


Fig. 35. Numărul de leucocite totale (A) și de limfocite (B) la Control și grupurile experimentale. Valorile sunt exprimate ca medie \pm SD. * / # $p < 0.05$; ** / ## $p < 0.01$; *** / ### $p < 0.001$. * – comparație cu lotul Control; # – comparație cu lotul CCl₄.

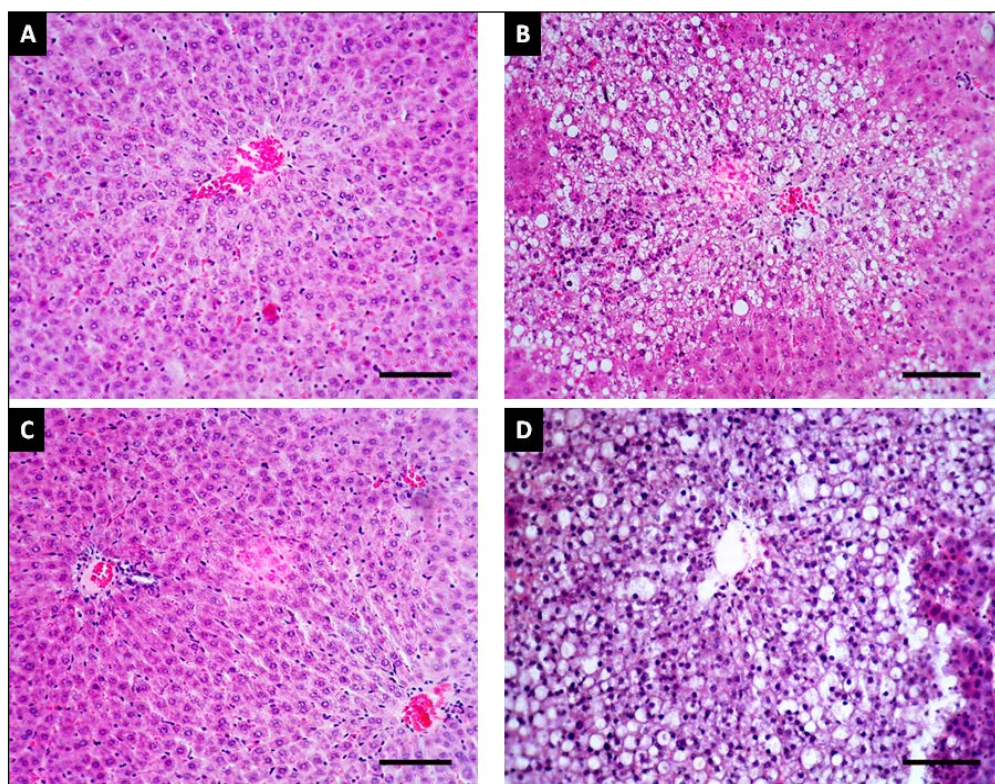


Fig. 36. Structura microscopică a ficatului la lotul Control și la grupurile experimentale. Control – (A); CCl₄ – (B); Extract de *M. sylvestris* – (C); Extract de *M. sylvestris* + CCl₄ – (D). Col. HE, x400, scala = 20 μ m.

Expunerea ficatului la tetracolorura de carbon a determinat apariția steatozei hepatice mixte, în parenchimul hepatic, cu prevalență în zona centrolobulară observându-se, pe arii extinse, distrofii grase macroveziculare și microveziculare (**Fig. 36B**). De asemenea, s-au remarcat infiltrate limfocitare perivascularare și în jurul necrozelor punctiforme, fapt care a sugerat caracterul acut al modificărilor observate. Alături de steatoza mixtă (micro-macro veziculară), s-a remarcat proliferarea celulelor Kupffer, toate aceste evenimente lezionale, caracterizând statusul inflamator hepatic. Acesta a avut răsunet în sânge, în urma necrozelor și distrofiilor hepatice, enzime (ALT, AST, $p < 0.001$) și citokine intrahepatocitare (TNF α , $p < 0.001$) intrând în torentul sangvin. Examinarea tabloului biochimic ar sugera acțiunea hepatoprotectoare a extractului de *M. sylvestris*, dacă nu ar fi disponibile date din examenul histopatologic al ficatului. Scăderea semnificativă a transaminazelor, a TNF α , a leucocitelor totale și a limfocitelor, comparativ cu lotul CCl₄ au reprezentat, în realitate, oglinda leziunii hepatice masive (Toma și colab., 2018). **Fig. 36D** demonstrează gradul ridicat de întindere al steatohepatitei (steatoză macroveziculară generalizată, cu punct de plecare pericentrolobular, cu invadarea profundă a parenchimului hepatic, fiind prezente de asemenea și infiltrate limfocitare – care au condus la scăderea limfocitelor circulante) situație asociată cu încetarea intrării în sânge a transaminazelor și a TNF α din cauza leziunii majore a parenchimului hepatic. Coadministrarea tetracolorurii de carbon cu extractul din fructe de *M. sylvestris* a indus o steatohepatită proeminentă care nu a fost restricționată centrolobular, ca în cazul grupului CCl₄. Distrofia lipidică a fost extinsă de la vena centrolobulară la sistemul portal și întreg parenchimul hepatic. Ficatul a devenit lipsit de procese metabolice specifice și de molecule precum transaminazele, implicate în reacții intrahepatocitare. Extractul de *M. sylvestris* a accentuat steatohepatita indusă cu tetracolorura de carbon, dovedindu-se toxic în raport cu funcția hepatică dereglată. Administrat individual, extractul nu a generat modificări morfologice hepatice (**Fig. 36C**), aspectul histologic fiind comparabil cu cel de control (**Fig. 36A**) (Toma și colab., 2018).

6.6.1. Discuții

De mai bine de jumătate de secol, modelul biologic al steatozei și inflamației hepatice a fost folosit și dezvoltat un corp larg de lucrări dintre care amintim contribuțiile lui Dong și colab. (2016), Itoh și colab. (2010), Masuda și colab. (2006), Sipes și colab. (1991), Hove și Hardin, (1951). Tetraclorura de carbon, diluată în ulei vegetal și administrată șobolanului de laborator, a indus hepatotoxicoză, insuficiență renală, anemie, necroze locale ale tractului gastro-intestinal și leziuni neuronale (Kader, 2017). Efectul pleiotrop al CCl_4 a fost folosit pentru investigarea acțiunii diferiților compuși biologici sau de sinteză, destinați potențialelor terapii hepato/nefro/neuro/hemato-protectoare (Janbaz și colab., 2002). Datele noastre au sugerat însă că extractul hidroglicerolalcoolic din fructe de *M. sylvestris* a potențat toxicitatea hepatică a CCl_4 (Toma și colab., 2018); toxicitatea matricei extractului considerăm că a fost cauza potențării toxicității CCl_4 , după cum au demonstrat și studiile lui Mihailović și colab. (2018). Autorii au arătat că extractul hidroalcoolic din fructe de *M. sylvestris* nu a avut toxicitate multiplă, ceea ce a sugerat absența efectului amplificator al extractului asupra toxicității hepatice a CCl_4 . Glicerolul prezent în matricea extractului a contribuit cel mai probabil la esterificarea acizilor grași liberi. Între conținutul citosolic de acizi grași polinesaturați și gradul de peroxidare lipidică există o relație de directă proporționalitate precum și între gradul de peroxidare lipidică și acumularea intracelulară a picăturilor lipidice (conținând și trigliceride), după cum a arătat Ding și colab. (2010). Datele noastre au sugerat că matrici de tipul etanol-glicerină nu sunt indicate în tratamente asociate cu steatohepatită nealcoolice (Toma și colab., 2018).

6.6.2. Concluzii

În cadrul modelului biologic al steatohepatitei nealcoolice, s-a putut observa că prezența antioxidanților dintr-un extract vegetal nu are

a priori efecte benefice, matricea de administrare având un rol decisiv sub aspectul efectului biologic al extractului. S-a remarcat, de asemenea, că steatohepatita indusă experimental cu CCl_4 a fost asociată cu creșterea răspunsului imun mediat celular și a $\text{TNF}\alpha$. Pe baza acestor date, calea de semnalizare a steatohepatitei induse cu CCl_4 ar fi limfocite – $\text{TNF}\alpha$. În plus, scăderea valorilor markerilor hepatici din ser nu reprezintă întotdeauna un semnal de regenerare hepatică. Uneori, ca și în cazul studiului nostru, scăderea markerilor hepatici sugerează gradul maxim de leziune, în urma căruia, ficatul nu mai deține rezerve enzimactice care, din cauza distrofiei grase și a necrozelor, sunt preluate de torentul sangvin local (Toma și colab., 2018).

6.7. Acțiunea extractului de *Hypericum perforatum* L. și *Hypericum maculatum* Crantz la șobolanul alb Wistar cu tulburare anxioasă indusă experimental

Tulburarea anxioasă a fost indusă, prin administrarea unei singure doze de N-metil-9H-piridol[5,4-b]indol-3-carboxamidă (FG-7142) 7.5 mg/kg corp, i.p., după 22 de zile de administrare distinctă, pe cale orală, a celor două extracte (350 mg/kg corp). Extractele de *H. perforatum* și *H. maculatum* au fost testate cu scopul evaluării proprietăților anxiolitice, în comparație cu acțiunea unui anxiolitic cunoscut, precum alprazolamul (APZ) (0.08 mg/kg corp) și în raport cu un antioxidant neuroprotectiv și fitoestrogenic canonic, precum quercitininul (Q). Quercitininul și extractele au fost administrate pe care enterală, în matrice de carboximetilceluloză (CMC). Lotul Control a fost tratat doar cu CMC.

Determinările au vizat hipocampusul, lobul frontal și sângele, acestea cuprinzând parametri ai stresului oxidativ – MDA, CAT, SOD (Fig. 37), ai stresului neuropsihic – corticosteronul (Fig. 38) și ai inflamației – $\text{IL-1}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ (Fig. 39), MCP1 (Fig. 40), IFN, MIP, RANTES (Fig.41) și $\text{NF-k}\beta$ și pNF-k β (Fig. 42) (Sevastre-Berghian și colab., 2018).

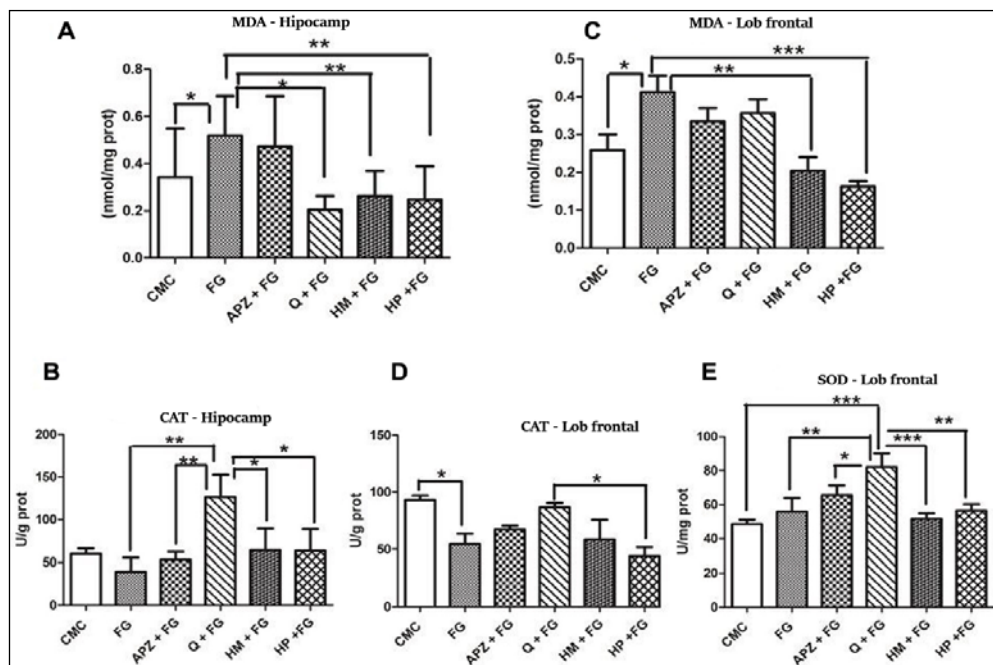


Fig. 37. Acțiunea compușilor naturali și a extractelor de *Hypericum* asupra balanței redox la nivelul hipocampusului și a lobului frontal. Quercetinul, *H. maculatum* (HM) și *H. perforatum* (HP) au scăzut nivelul MDA în hipocamp (A); HM și HP au scăzut peroxidarea lipidică în lobul frontal (C). MDA a prezentat o concentrație ridicată în hipocamp și lobul frontal la grupul FG (A, C). În hipocamp, CAT a fost scăzută, după administrarea FG, dar diferențele nu au fost semnificative comparativ cu grupul CMC. După 21 de zile de tratament cu Q, CAT a fost crescută (B, D) atât în hipocamp, cât și în lobul frontal. Q a scăzut activitatea SOD în lobul frontal (în hipocamp nu s-au remarcat variații astfel că nu am prezentat valorile). Valorile sunt exprimate ca medie \pm SD.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

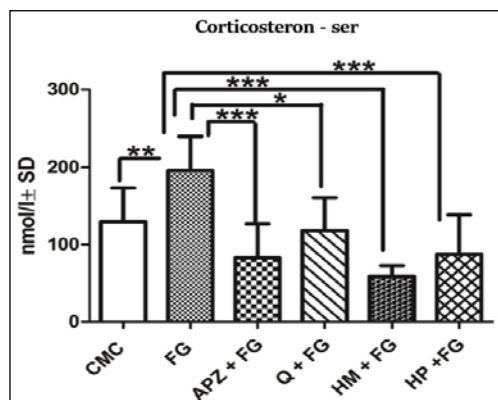


Fig. 38. Valorile serice ale corticosteronului la Control și la grupurile experimentale. Tratamentul anxiogenic cu FG a crescut semnificativ nivelul corticosteronului seric, în comparație cu lotul CMC; APZ, HM și HP au scăzut valoarea serică a corticosteronului. Valorile sunt exprimate ca medie \pm SD.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

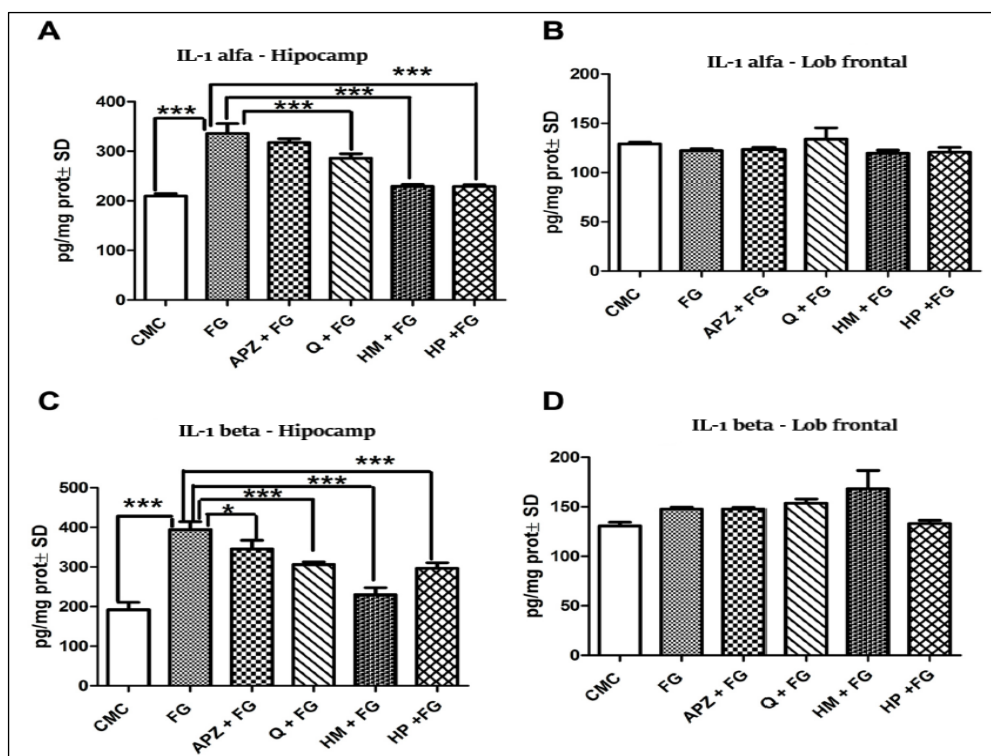


Fig. 39. Valorile IL-1 α și IL-1 β la grupul de Control și la loturile experimentale. Hipocampus a prezentat creșteri semnificative ale IL-1 α și IL-1 β la animalele expuse agentului inductor al anxietății (FG), în comparație cu grupul CMC. Q, HM și HP au scăzut exprimarea IL-1 α , cât și a IL-1 β în hipocampus, comparativ cu lotul FG. Administrarea APZ a fost asociată cu scăderea IL-1 β doar în hipocampus (A,C). Valorile sunt exprimate ca medie \pm SD.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

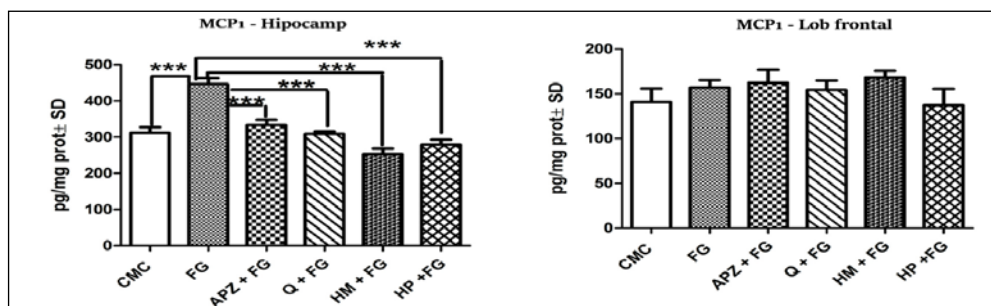


Fig. 40. Concentrația MCP1 în hipocampus și lobul frontal, la Control și la grupurile experimentale. MCP1 a marcat o creștere după administrarea FG-7142. La nivelul hipocampusului, s-a înregistrat creșterea semnificativă a MCP1 la loturile APZ, Q, HM și HP, comparativ cu lotul FG. Valorile sunt exprimate ca medie \pm SD.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

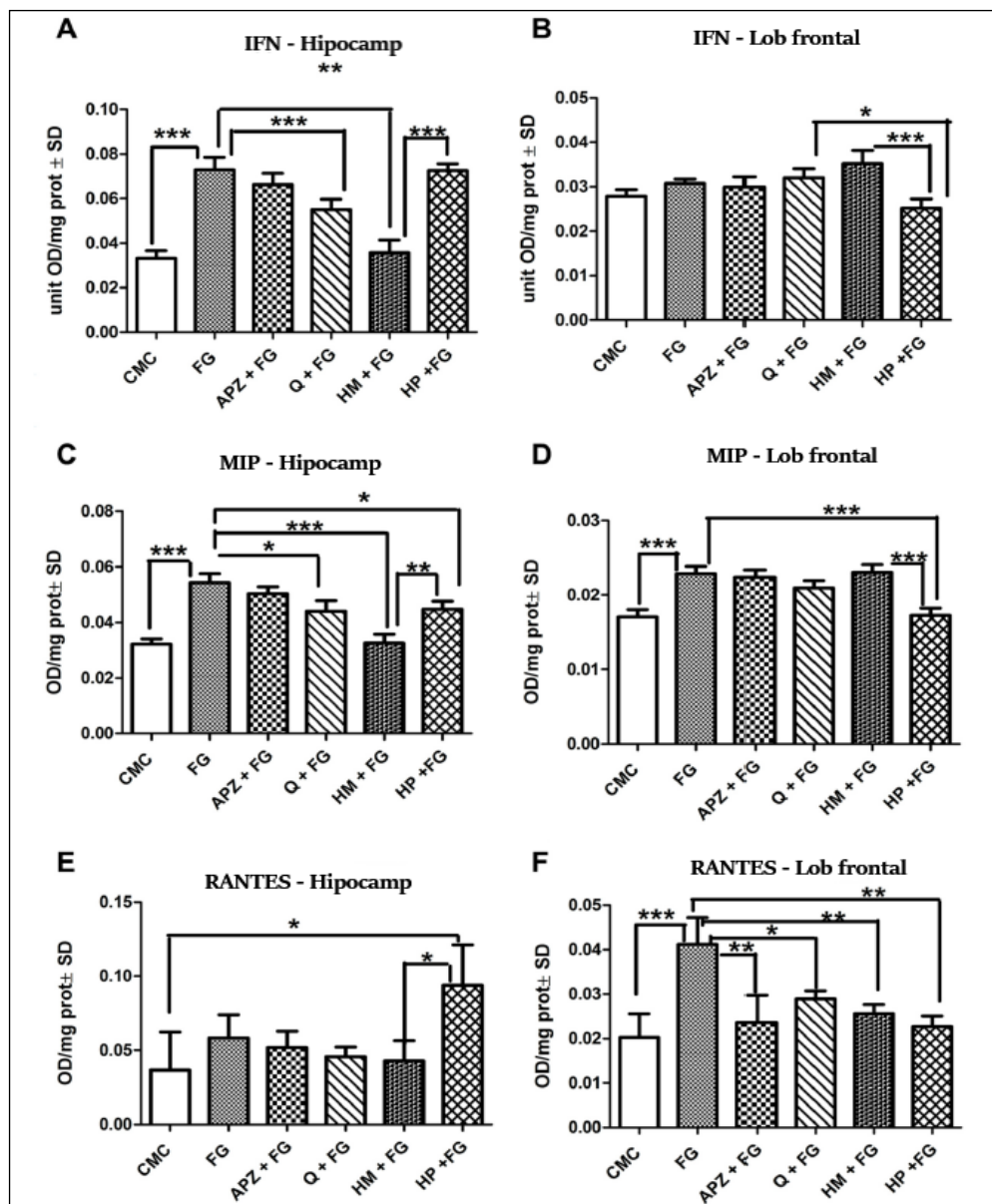


Fig. 41. Nivelul de exprimare al IFN, MIP și RANTES la Control și la grupurile experimentale, după tratamentul cu Q, extracte de *Hypericum* și alprazolam, pe fondul anxietății induse de FG-7142. Nivelurile IFN au fost scăzute la Q și HM (A, B). HP a determinat creșterea IFN, în raport cu acțiunea HM, în hipocamp (A), în timp ce în lobul frontal, IFN a fost semnificativ scăzut de HP, comparativ cu HM (B). MIP a marcat o creștere atât în hipocamp cât și în lobul frontal, la animalele tratate cu FG, în comparație cu CMC (C, D), în timp ce RANTES a prezentat creșteri ale concentrației doar în lobul frontal al animalelor cu comportament anxios indus experimental

(datele studiilor comportamentale nu sunt prezentate aici). Q, HM și HP au scăzut nivelurile MIP în hipocamp (C). În lobul frontal, valorile RANTES au fost semnificativ scăzute la grupurile APZ, Q, HM și HP. MIP și RANTES au marcat creșteri ale valorilor în hipocamp doar după tratamentul cu HP, nu și după administrarea de HM (C, E). În lobul frontal, ambii parametri (MIP, RANTES) au avut concentrația scăzută după tratamentul cu HP, comparativ cu efectul HM. Valorile sunt exprimate ca medie \pm SD. (Sevastre-Berghian și colab., 2018).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

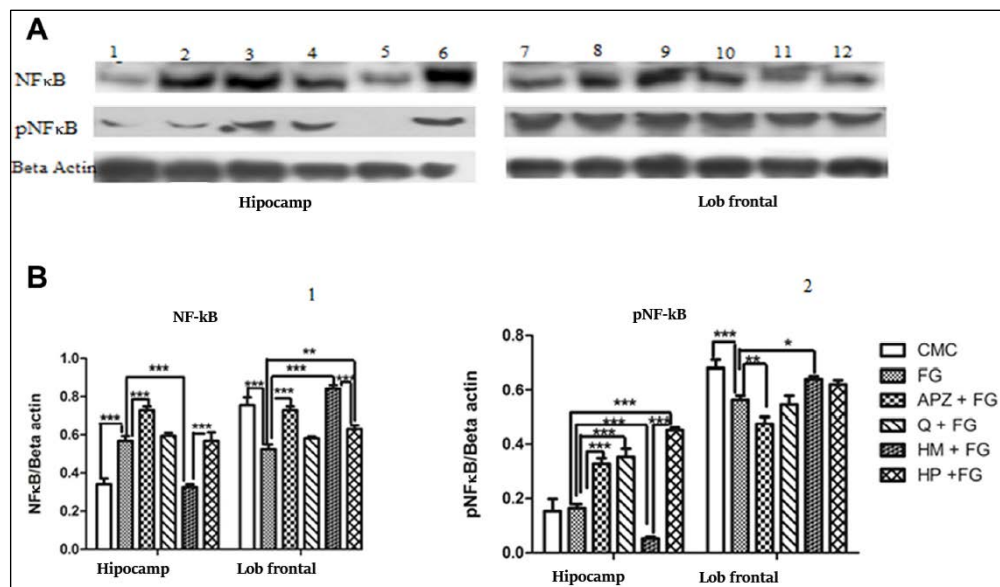


Fig. 42. Cuantificarea exprimării NF- κ B și pNF- κ B la lotul Control și la grupurile experimentale. Exprimarea NF- κ B și pNF- κ B a fost analizată prin Western blot. Analiza imaginilor cu benzile rezultate în urma Western blot a fost efectuată prin densitometrie. Rezultatele au fost normalizate față de β -actină. 1-6: hipocamp (1 – CMC; 2 – FG; 3 – APZ + FG; 4 – Q + FG; 5 – HM + FG; 6 – HP + FG); 7-12: lob frontal (7 – CMC; 8 – FG; 9 – APZ + FG; 10 – Q + FG; 11 – HM + FG; 12 – HP + FG). Administrarea de FG a crescut semnificativ nivelul NF- κ B în hipocamp și a scăzut exprimarea factorului nuclear κ B și a formei activate a acestuia (pNF- κ B) în lobul frontal, comparativ cu grupul de Control. APZ a amplificat exprimarea NF- κ B atât în hipocamp, cât și în lobul frontal. Q a stimulat exprimarea pNF- κ B în hipocamp, în timp ce, în lobul frontal, administrarea HM a condus la creșterea semnificativă a NF- κ B și pNF- κ B. În hipocamp, HM a scăzut exprimarea NF- κ B și pNF- κ B. Valorile sunt exprimate ca medie \pm SD. (Sevastre-Berghian și colab., 2018)

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

6.7.1. Discuții

Cercetări adiacente spectrului patologiei depresiv-anxioase demonstrează faptul că, extractul de *H. perforatum*: ameliorează efectele apomorfinei, în condiții experimentale de leziune a corpurilor striate; scade nivelul malondialdehidei la nivelul nucleilor caudat și lenticular lezați; crește activitatea catalazei (CAT); scade concentrația glutatationului redus (GSH) și normalizează exprimarea GFAP la locul leziunii (Kiasalari și colab., 2016). Ganji și colab. (2017) au studiat efectul extractului hidroalcoolic de *H. perforatum*, în condiții de anxietate indusă prin dietă bogată în lipide (High Fat Diet), observând efectul dozodependent de scădere a intensității reacțiilor anxioase (prin *elevated-plus maze*), în urma administrării, timp de 3 luni, a extractului de Sunătoare. Alți autori au studiat efectul aceluiși tip de extract, asupra plasticității neuronilor corticali, la om, în urma stimulării magnetice transcraniale. Stimularea electrică transcranială directă induce fenomene de remodelare neuronală, iar la subiecții cărora li s-a administrat extract de *H. perforatum*, intensitatea semnalelor asociate remodelării neuronale (*motor-evoked potentials*) a fost amplificată. Acest fapt demonstrează că *H. perforatum* stimulează plasticitatea neuronilor corticali (Concerto și colab., 2018). Cercetări recente abordează studiul clinic comparativ al hiperforinei cu antidepressive triciclice și inhibitoare ale recaptării serotoninei. Rezultatele studiilor clinice demonstrează efecte terapeutice, doar în cazurile ușoare spre moderate ale tulburării depresive, iar concluzia autorilor denotă absența unor date clinice robuste (Zirak și colab., 2019). Studiile privind bioactivitatea speciei *H. androsaemum* au arătat efecte comparabile cu cele ale speciei *H. perforatum*, specia *H. androsaemum*, fiind întrebuințată pentru aceleași patologii ca și Sunătoarea (Nabavi și colab., 2018).

În cercetările noastre, s-a ales un model farmacologic comportamental al anxietății induse cu FG 7142. Compusul este un agonist invers parțial al situsului de reacție alosterică a receptorului pentru benzodiazepine, cu afinitate crescută pentru subunitatea $\alpha 1$ care conține receptorul GABA A. FG 7142 modulează fluxul de Cl^- indus de GABA și interacționează cu sistemele serotoninergice, dopaminergice, colinergice și noradrenergice implicate în rețele neuronale ale tulburării de tip anxios (Kaminska și Rogoz, 2016). Administrarea alprazolamului a fost controlul pozitiv al efectului anxiolitic urmărit la extractele de *Hypericum* (Mohan și colab., 2011). Administrarea de FG 7142 a determinat creșterea stresului oxidativ în creierul animalelor anxioase. Aceste reacții sunt susținute de rezultatele cercetărilor lui Bouayed și colab. (2006). Aceștia au menționat creșterea concentrației cerebrale de proteine carbonilate (cortexul prefrontal), niveluri ridicate ale MDA în hipocamp și amigdală și creșterea concentrației plasmatice a 8-isoprostan, a activității lutation reductazei 1 și a glioxilazei 1, în creierul șoarecilor anxioși. Este, totodată, bine cunoscută vulnerabilitatea creierului la stresul oxidativ, dat fiind conținutul ridicat în acizi grași polinesaturați a substanței cerebrale și capacitatea antioxidantă scăzută a țesutului cerebral, alături de o rată metabolică proeminentă (mare generatoare de radicali liberi). Hipericina și hiperforina (v. analiza chimică a extractelor de *Hypericum* studiate care se regăsește în Sevastre-Berghian și colab., 2018) sunt cei mai importanți compuși bioactivi ai genului *Hypericum*, cu acțiune antidepresivă. Antioxidanți precum flavonoidele, pot crește activitatea farmacologică a hipericinei și hiperforinei, prin captarea radicalilor liberi și „degajarea” spațiului de acțiune a hipericinei, respectiv hiperforinei.

Rezultatele noastre au demonstrat că, după 21 de zile de tratament, quercetinelul a diminuat peroxidările lipidice și a stimulat activitatea antioxidantă a hipocampului. Efectul anxiogen al FG a fost

prevenit de *H. maculatum* și *H. perforatum*, atât în lobul frontal, cât și la nivelul hipocampului (Sevastre-Berghian și colab., 2018). Aceste rezultate au confirmat că debalansarea activității antioxidante și creșterea stresului oxidativ neuronal constituie mecanisme patologice aflate la baza diverselor boli neuropsihice (Masood și colab., 2008). Totodată, s-a observat că stimularea exprimării IL-1 α și IL-1 β în hipocamp, de către agentul anxiogen, a fost prevenită de administrarea quercetinului și a celor două extracte de *Hypericum*, date aflate în concordanță cu rezultatele lui Krolow și colab. (2014).

Sub aspectul reacțiilor inflamatorii, s-a demonstrat că anxietatea a fost asociată cu creșterea la nivel cerebral a citokinelor proinflamatorii (ex. IL-1 α , IL-2, IL-8, IL-9, IFN γ , TNF α , MCP1, MIP1 α , RANTES), caracter specific mai mult tulburării anxioase/tulburării depresive de tip anxios, decât în situații depresive cu alte simptome (Vogelzangs și colab., 2013). Legătura exactă între inflamație și depresie nu a fost pe deplin înțeleasă până acum, dar citokinele proinflamatorii activează p38-MAPK, care la rândul ei activează transportorul serotoninei și conduce la creșterea uptake-ului și scăderea concentrației sinaptice ale acesteia. În plus, citokinele proinflamatoare (ex. IL-8) direcționează și accelerează triptofanul (precursorul serotoninei) spre calea metabolică a kineureninei, astfel, conducând la scăderea serotoninei cerebrale (Maldonado-Bouchard și colab., 2016). O singură doză, administrată intraperitoneal, de FG 7142, a crescut exprimarea hipocampică a NF-k β . Extractul de *H. maculatum*, pe fondul terapiei anxiogene, a diminuat exprimarea și activarea NF-k β în hipocamp, iar alprazolamul a crescut exprimarea NF-k β atât în hipocamp, cât și în lobul frontal.

În cele din urmă, studiile noastre au demonstrat că quercetinul, *H. maculatum*, *H. perforatum* și alprazolamul au avut efecte antiinflamatorii și au redus semnificativ nivelul seric al corticosteronului. Quercetinul și extractele de *Hypericum* au determinat scăderea peroxidărilor lipidice în

hipocamp și în lobul frontal, la animalele anxioase. Quercetinul a crescut însă activitatea CAT, alături de exprimarea NF- κ B și a pNF- κ B, în hipocamp și lobul frontal. Aceste rezultate au sugerat că administrarea compușilor naturali, precum quercetinul și a extractelor de *Hypericum*, oferă protecție țesutului cerebral și joacă rolul de adjuvanți în terapia anxiolitică clasică (Sevastre-Berghian și colab., 2018).

6.7.2. Concluzii

Modelul biologic utilizat, în vederea stabilirii acțiunii anxiolitice a extractelor de *Hypericum*, a relevat trei chestiuni esențiale: (i) antioxidanții pot avea efecte anxiolitice și antidepresive; (ii) reacția neuroimună din tulburarea anxioasă, a fost asociată cu creșterea stresului oxidativ; (iii) extractele de *Hypericum* prezintă proprietăți adjuvante (nu le considerăm terapeutice) în terapia anxiolitică.

6.8. Efectul extractului de *Cornus mas* L. asupra arhitecturii și apoptozei testiculare

Nanoparticule de argint funcționalizate cu extract de *C. mas* (AgNP-CM) au fost administrate timp de 45 de zile în două doze (D1:0.8 mg/kg corp și D2: 1.5 mg/kg corp). După 7, respectiv 15 zile, de la încetarea tratamentului cu AgNP-CM, fragmente din testicul, de la Control și grupurile experimentale, au fost prelevate, fixate 3 zile în formaldehidă neutră 10%, histoprosesate, înglobate în parafină, secționate la 5 μ m și supuse apoi celor două linii de colorare: hematoxilină-eozină și TUNEL (Opriș și colab., 2019).

La lotul Control s-a observat structura și organizarea normală a tubilor seminiferi (**Fig. 43A**), corespunzătoare grupului T7. La grupul T7D1 (**Fig. 43B**), s-au observat alterări ale celulelor Sertoli (săgeată neagră). Acestea au fost detașate de linia germinală, iar în cadrul

epiteliului spermatogenic s-au observat vacuolizări extracelulare. La grupul T7D2 (**Fig. 43C**), doar un mic număr de celule Sertoli au putut fi identificate (indicate în figură). Alterarea celulelor Sertoli a condus la eroziunea membranei bazale și apariția spațiilor lacunare (marcate cu *) în cadrul epiteliului spermatogen. Rarefierea acestuia și prezența vacuolelor în țesutul interstițial au fost observate atât la lotul T7D1 (B), cât și la T7D2 (C). La grupul T15D1, reducerea grosimii epiteliului spermatogen a fost observată în mulți tubi seminiferi, precum și o accentuată tendință de dezorganizare epitelială. Rar, celulele Sertoli au fost prezente pe membrana bazală, dar au fost profund alterate și fără invaginări (Oprîș și colab., 2019).

La grupul T15D2, coeziunea celulelor în epiteliu a fost compromisă în majoritatea tubilor și diferite tipuri de celule au ocupat întregul lumen. Punctiform, s-au observat celule Sertoli rămase atașate de membrana bazală, dar cu structură alterată. La nivelul tubilor seminiferi, au fost observate frecvente întreruperi ale endoteliului, generate de absența celulelor Sertoli. La acest grup, s-au observat cele mai multe vacuolizări interstițiale.

Celulele Leydig apoptotice (**Fig. 43D – F; Fig. 44D – F**), observate prin imunoreacția TUNEL, au fost mai numeroase la grupurile tratate decât la lotul Control. Celulele apoptotice la grupurile tratate (D1 și D2), atât la timpul T7, cât și la T15, au fost mai numeroase decât la grupul Control (**Fig. 45**). Dacă la T7, sub aspectul apoptozei celulelor Leydig, nu au existat diferențe între D1 și D2, la T15D2, numărul celulelor apoptotice Leydig a fost semnificativ mai mare, comparativ cu lotul T15D1 ($p < 0.001$). Important de notat este că apoptoza a rămas la un nivel ridicat considerabil, chiar după moartea celulară masivă inițială (rată apoptotică mare în grupurile T7 comparativ cu T15) (Oprîș și colab., 2019).

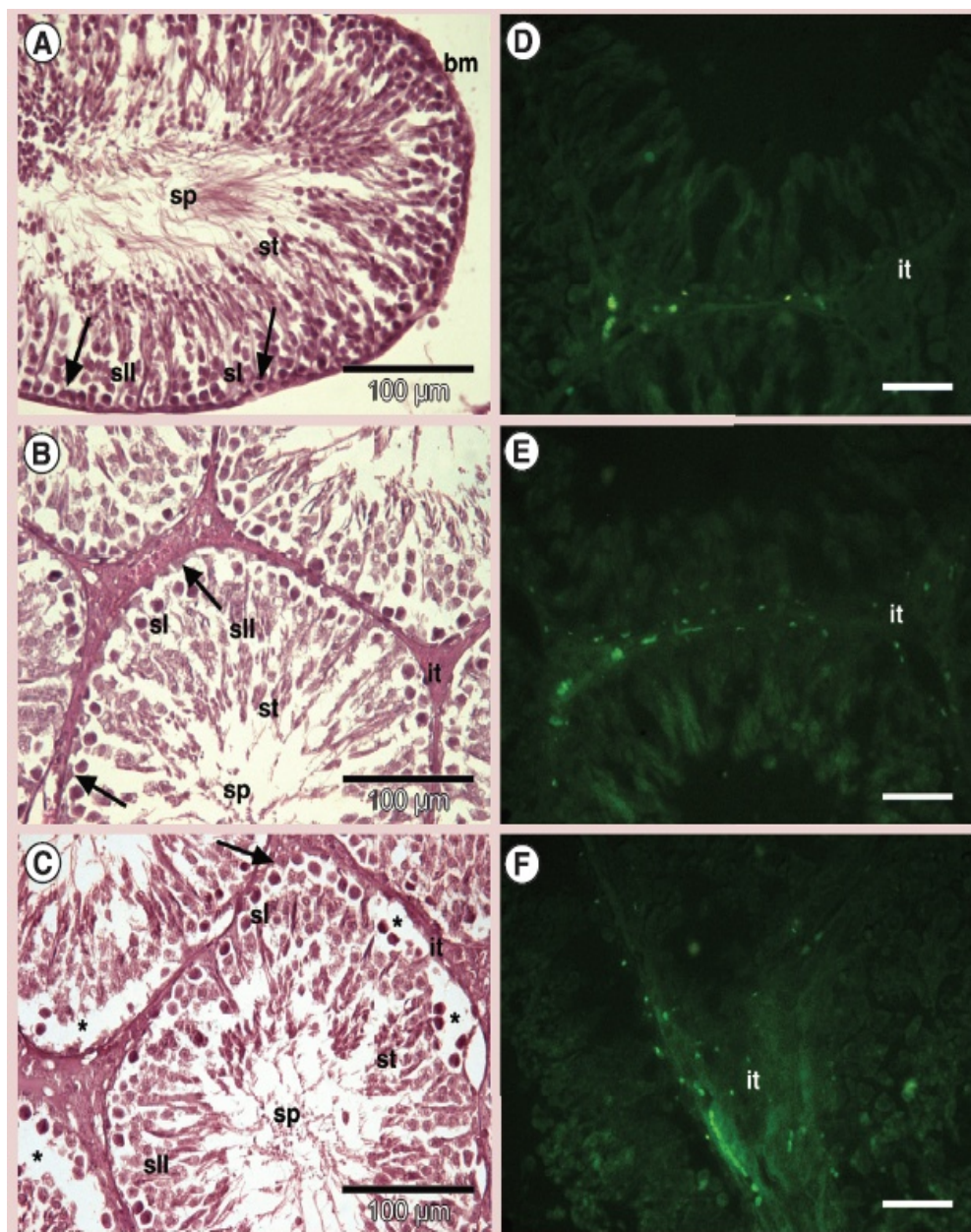


Fig. 43. Aspecte ale structurii testiculare evidențiate prin colorația H&E (A-C) ($\times 100$, scala = 100 μm) și evaluarea celulelor apoptotice prin testul TUNEL (D-F) ($\times 400$, scala = 20 μm) la 7 zile după tratamentul cu nanoparticule de Ag funcționalizate cu *C. mas*, la grupul Control (A, D) și la loturile experimentale (B, C, E, F). sl – spermatocite primare; sll – spermatocite secundare; st – spermatidii; sp – celule spermatice. Semnalul pozitiv al TUNEL (spoturi verzi) a fost observat în țesutul interstițial (it) la Control (D), T7D1 (E) și T7D2 (F) (Opriș și colab., 2019).

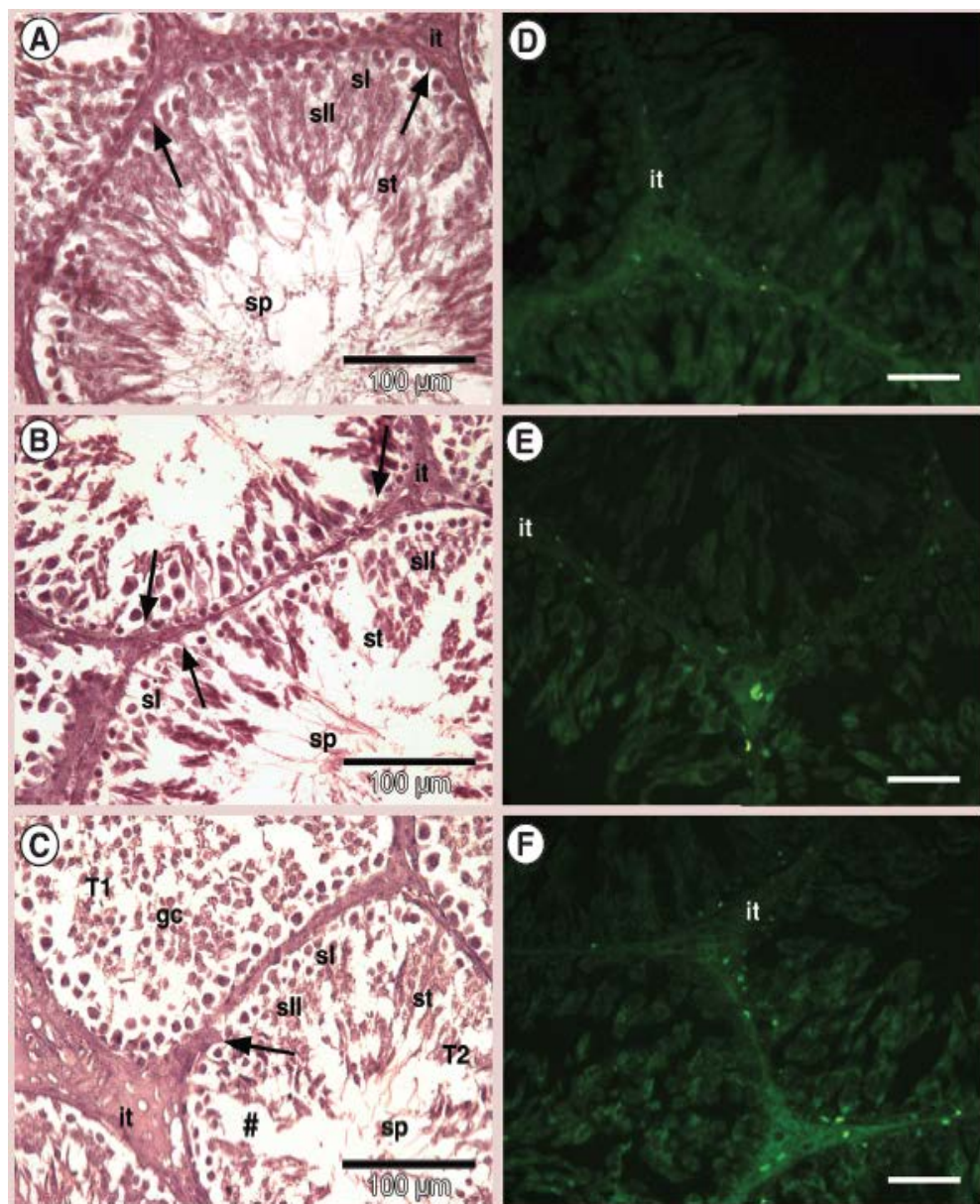


Fig. 44. Aspecte ale structurii testiculare evidențiate prin colorația H&E (A-C) ($\times 100$, scala = $100\ \mu\text{m}$) și evaluarea celulelor apoptotice prin testul TUNEL (D-F) ($\times 400$, scala = $20\ \mu\text{m}$), la 15 zile după tratamentul cu nanoparticule de Ag funcționalizate cu *C. mas*, la grupul Control (A, D) și la loturile experimentale (B, C, E, F). sl – spermatocite primare; sll – spermatocite secundare; st – spermatidii; sp – celule spermatice. Semnalul pozitiv al TUNEL (spoturi verzi) a fost observat în țesutul interstițial (it) la Control (D), T15D1 (E) și T15D2 (F).

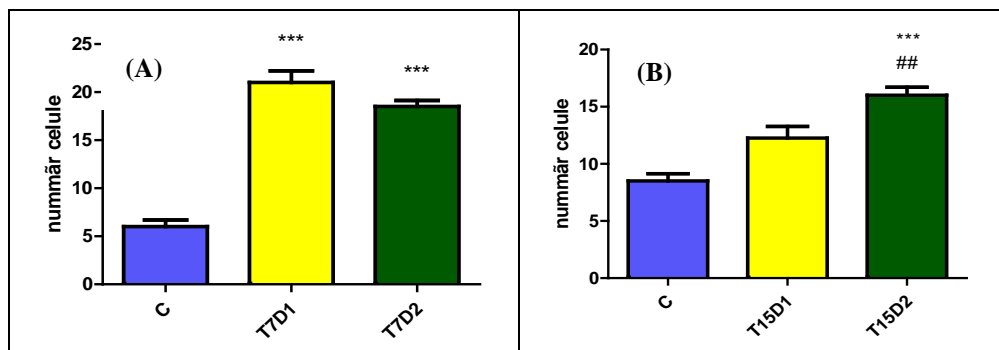


Fig. 45. Numărul de celule apoptotice la T7 (A) și la T15 (B), la Control și grupurile experimentale. Apoptoza a fost semnificativ crescută la grupurile tratate cu AgNP-CM, comparativ cu grupurile Control, atât la 7, cât și la 15 zile, după încetarea administrării de AgNP-CM. Valorile sunt reprezentate ca medie \pm SD.

*** $p < 0.001$, comparație cu lotul C – Control; ## $p < 0.01$, comparație cu lotul D2.

6.8.1. Discuții

În general, bioactivitatea extractelor de *Cornus* este încadrată de efectul puternic antioxidant al fructelor de *C. mas*, *C. officinalis* sau *C. alba*, de efectele indirecte, grație diminuării considerabile a peroxidărilor lipidice (precum efectul cardio/nefro/hepato/neuro-protector), efecte reglatoare asupra metabolismului glucidic și de efectul antitumoral/antiproliferativ remarcabil. În anul 2006, Jayaprakaseu și colab. au studiat efectul antioxidant și reglator asupra metabolismului glucidic al extractului de fructe de *C. mas* în contextul unui tablou lipidic patologic (dietă suplimentată cu grăsimi). Extractul a normalizat glicemia, a crescut nivelul insulinei și a diminuat peroxidările lipidice din țesuturile cu risc major în sindromul metabolic (hepatic, renal, cardiac, nervos), efecte care au fost confirmate de Soltani și colab. (2015). Proprietățile antioxidante și antiinflamatoare la *C. mas* au fost evidențiate prin diferite modele biologice (inflamație indusă cu terebentină, toxicoză cu CCl_4). Datele au arătat scăderea IL-1 β și IL-13, creșterea IL-10, reducerea exudatului inflamator (Hassanpour și colab., 2011; Moldovan și colab., 2016), scăderea

NF- κ B, NO, IL-12, TNF- α și inhibarea macrofagelor CD68⁺ la nivelul plăcilor psoriazice (Crișan și colab., 2018).

Folosind șobolani Wistar, în contextul stresului oxidativ generat de radicalii triclorometil ai CCl₄, testarea efectelor extractului din fructe de *C. mas* a reliefat acțiunea cardioprotectivă a extractului, fundamentată pe reducerea peroxidărilor lipidice inclusiv la nivelul miocardului. Astfel, concentrația Ca²⁺ intracelular a fost normalizată, iar transportul transmembranar al ionilor, asociat cu integritatea membranelor, a fost, de asemenea, normalizat, fiziopatologic nemaiobservându-se tulburări de conducere miocardică. Mecanismele implicate, în normalizarea funcției de conducere a miocardului, se întâlnesc și în cazul remedierii renale în urma expunerii la CCl₄, când extractul din fructe de *C. mas* a fost, de asemenea, eficient în redresarea structurală și funcțională a rinichiului (Eshaghi și colab., 2012; Haghi și colab., 2014). Interesantă este cercetarea lui Bujor și colab. (2019), în care se demonstrează că, la nivelul endoteliului vascular, *C. mas* are un efect stimulator pentru eNOS și nu inhibă arginaza, iar producția de NO este stimulată (efect antihipertensiv omolog alicinei și extractelor de *Allium*). Savikin și colab. (2007) au studiat efectul citotoxic *in vitro* al extractului de *C. mas* și *C. officinalis*, iar rezultatele au demonstrat un efect citotoxic proeminent asupra liniilor celulare tumorale de tip HeLa și LS174. În paralel, Leskovac și colab. (2007) au demonstrat efectul radioprotectiv al extractului de *C. mas* comparativ cu extracte din *Crataegus monogyna* și *Gentianella austriaca*. Rezultatele au arătat faptul că, expunerea limfocitelor B la radiații ionizante, urmată apoi de tratarea acestora cu diferite concentrații de extract de *C. mas*, a redus numărul micronucleilor și a diminuat stresul oxidativ (în acest caz, scăderea activității CAT, SOD). Unele studii au demonstrat că nanoparticulele de Ag, administrate pe cale orală la șobolani, se acumulează în ficat, splină, timus, rinichi, plămâni, testicule, perete stomacal, creier și miocard. Pe de altă parte, efectele biologice ale AgNP precum acțiune antiinflamatoare, antibacteriană, antivirală și antifungică recomandă utilizarea AgNP sub diverse forme, în terapia curentă (Rahman și colab., 2009).

Distribuția acestor nanoparticule este, cu preponderență, în ficat, urmat de rinichi, testicule și splină (Kim și colab., 2008). Nanoparticulele de argint au indus distrofie hialină difuză în interstițiul și sistemul tubular renal, necroză hepatocitară multifocală, focare hemoragice renale și hepatice sau necroză limfocitară unifocală splenică (Wen și colab., 2017). Puține studii au urmărit efectul nanoparticulelor de argint asupra testiculului la șobolan, dar cercetările lui Thakur și colab. (2014) au arătat că nanoparticulele de argint pot interfera cu spermatogeneza, prin inducerea apoptozei în linia germinală, vacuolizarea celulelor Sertoli, degradarea membranei bazale și a arhitecturii epiteliului tubular, după expunerea acută. Studiul nostru a urmărit efectele expunerii la nanoparticule de argint funcționalizate cu extract de *C. mas*, la 7, respectiv 15 zile, după încetarea administrării enterale a acestora. Funcționalizarea cu *C. mas* a avut rolul de a reduce efectele prooxidante și de toxicitate poliorganică pe care AgNP le generează. Datele noastre au confirmat datele din literatură și au demonstrat efectul prelungit al AgNP funcționalizate cu *C. mas*, asupra structurii și apoptozei testiculare, însă funcționalizarea cu extractul a determinat absența variațiilor semnificative ale stresului oxidativ (Opriș și colab., 2019).

6.8.2. Concluzii

În cazul modelului biologic folosit, în care, AgNP-CM au fost administrate în condiții normale, s-a remarcat, ca și în cazul studiilor cu alicină, plasticitatea structurală și metabolică a șobolanului alb Wistar. Totodată, prezența compușilor din *C. mas* a determinat stimularea acțiunii AgNP relevată de amplitudinea apoptozei și a leziunilor testiculare observate (Opriș și colab., 2019).

7.

Stres oxidativ indus prin stres neuropsihic – biologia mecanismelor celulare din hipocamp implicate în adaptare la factorul stresor

7.1. Design experimental

Pentru studierea mecanismelor de adaptare structurală și biochimică la stresul de imobilizare (model biologic pentru stresul neuropsihic), s-au efectuat o serie de cercetări, folosind șobolani albi Wistar, femele, cu greutatea de 180 ± 20 g, cu acces liber la apă și hrană, menținuți în condiții zooigienice corespunzătoare, ritm lumină/întuneric 12/12h, cu dietă standard (pelet *Cantacuzino*). Experimentele s-au desfășurat în acord cu Directiva Consiliului UE 2010/63/UE și cu avizul de etică al Universității Babeș-Bolyai nr. 2012/3.02.2016. **Tabelul 22** sintetizează organizarea experimentelor derulate în Biobaza Facultății de Biologie și Geologie de pe Str. Clinicilor, nr. 5-7, Cluj-Napoca. Recoltarea probelor s-a efectuat în condiții de narcoză eterică a animalelor experimentale (acestea au menținute într-o incintă etanșă, până la pierderea reflexelor de redresare) (Toma și colab., 2017).

Tabelul 22. Designul experimental al studiilor referitoare la biologia stresului neuropsihic și legătura acestuia cu statusul redox

C – Control	Probe recoltate	Analize efectuate
S3D – 3h/zi expunere la stres de imobilizare, timp de 3 zile consecutiv	sânge	3-NT, CAT, GPX, CS

C – Control	Probe recoltate	Analize efectuate
S7D – 3h/zi expunere la stres de imobilizare, timp de 7 zile consecutiv	creier	Col. Nissl, Col. Acridinorange, CyOx, ATPază, MAO

Legendă: 3-NT – 3-nitrotirozină; CAT – catalază; GPX – glutation peroxidază; CS – corticosteron; CyOx – citocromoxidază; ATPază – adenozintrifosfatază; MAO – monoaminooxidază (Toma și colab., 2017).

7.2. Protocoale experimentale

7.2.1. Metode spectrofotometrice – evaluarea activității catalazei

Metodele spectrofotometrice au fost folosite pentru determinarea activității catalazei. Tehnica folosită (metoda cinetică) a fost reprezentată de spectroscopia UV-vis, cu ajutorul căreia s-a corelat stingerea semnalului pentru apa oxigenată cu activitatea catalazică din probă (Toma și colab., 2016; 2017).

7.2.2. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Prin ELISA (kituri specifice de la Abcam, UK) s-a cuantificat 3-NT, GPX și CS. Serul a fost procesat după instrucțiunile producătorului. Rezultatele au fost exprimate ca medie \pm SEM (Toma și colab., 2017).

7.2.3. Metode histochimice și de fluorescență

În cadrul acestor metode, proba de țesut este înghețată brusc și secționată la diverse grosimi, cu ajutorul criotomului. Din probele cerebrale de control și din cele provenite de la grupurile experimentale, s-au efectuat secțiuni coronale de 10 μ m, tratate apoi după protocoalele specifice (Wachstein și colab., 1960; Gonzales-Lima și Cada, 1998; Pilati și colab., 2008) în vederea colorării zonelor pozitive pentru CyOx, ATPază și MAO. Evaluarea acestor enzime, prin metode histochimice pe secțiuni, se bazează pe reacția moleculei de interes cu un mediu de incubare specific (cu citocrom C pentru CyOx, ATP pentru ATPază și tryptamină clorhidrat

pentru MAO), în urma căreia se formează compușii de degradare enzimatică corespunzători. Aceștia, vor reacționa cu săruri de diazoniu, formând complecși moleculari stabili, colorați și insolubili în mediu apos. Reacția de culoare, astfel apărută, este direct proporțională cu activitatea enzimei în teritoriul țesutului aflat în secțiune.

Tot pe secțiuni obținute la criotom se pot aplica tehnici de fluorescență directe, cum este și colorarea acizilor nucleici cu acridinorange. Secțiunile groase de 10 μm se incubează, la temperatura camerei, cu o soluție apoasă 0.1% acridinorange, timp de 10 minute; se spală, apoi, secțiunile cu PBS 0.6 mM, pH 6, se trec rapid printr-o baie de acid acetic 0.5%, apoi, printr-o baie de CaCl_2 1%. Apoi, se clătesc din nou în PBS 0.6 mM și pH 6 și se montează în apă sau tampon fosfat. Examenul microscopic se efectuează imediat, în lumină UV, cu filtru verde. ADN emite o fluorescență verde, iar ARN (adesea ecranat de fluorescența ADN) o fluorescență roșie (Evenson și Darzynkiewicz, 1990; Evenson și colab., 1991). Zona cerebrală investigată a fost aria CA3 hipocampică, folosind un microscop Optika B-383LD2 (Toma și colab., 2017).

7.2.4. Metode histologice

Pentru analiza histologică, probele de creier au fost fixate în formaldehidă neutră 10%, timp de 3 zile. După fixare, țesutul a fost histoprocesat și inclus în parafină. Din blocurile de parafină obținute, s-au efectuat secțiuni groase de 5 μm , care au fost apoi supuse colorației Nissl. Aria de colorare a fost cuantificată folosind programul ImageJ. Zona cerebrală investigată a fost aria CA3 hipocampică, folosind un microscop Optika B-383LD2 (Toma și colab., 2017).

7.2.5. Microscopie electronică cu transmisie

În vederea examenului ultrastructural cu microscopia electronică cu transmisie, imediat după recoltarea creierului, s-au prelevat fragmente

de cca. 1 mm³ care au fost introduse în glutaraldehidă – PBS timp de 1 oră. După fixare, probele au fost procesate după protocol descris de Crăciun și Barbu-Tudoran (2013). Celulele investigate au fost neuronii piramidali trisnaptici ai ariei CA3 precum și neurogliile aferente (Toma și colab., 2017).

7.2.6. Analiză statistică

Toate analizele statistice au fost efectuate folosind software-ul GraphPad Prism, versiunea 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Rezultatele au fost exprimate ca medie \pm deviația standard a mediei (SD). Datele au fost supuse ANOVA urmată de testul Bonferroni. Valoarea lui p asociat testului post-hoc Bonferroni, mai mică de 0.05, a fost considerată semnificativă statistic. Coeficienții de corelație au fost interpretați după scala Colton. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Toma și colab., 2017).

7.3. Efectul de *stress-buffering* și structură microscopică la neuroni CA3

Stresul de 3 și 7 zile a determinat scăderea 3-NT în sânge (**Fig. 46A**, $p < 0.001$) în timp ce CAT și GPX (**Fig. 46B** și **Fig. 46C**) au prezentat creșteri semnificative ($p < 0.001$ pentru CAT și $p < 0.05$ pentru GPX). Reacția defensivă antioxidantă a fost mult mai proeminentă, după 7 zile de stres decât după 3 zile de stres de imobilizare repetată. În privința variațiilor CS (**Fig. 46D**), acestea au demonstrat activarea axei HHHS care a condus la creșterea progresivă a CS din sânge, direct proporțional cu timpul de stres. Histoenzimologic (**Fig. 47**), CyOx și ATPaza au marcat o scădere importantă (cca. 2 unități pe scala de măsurare a intensității reacției după Grover și colab., 2015), de-a lungul perioadei de expunere la stresul de imobilizare, în timp ce MAO a fost influențată moderat, scăderea acesteia însumând aproximativ 1 unitate, pe scala de măsurare a intensității reacției.

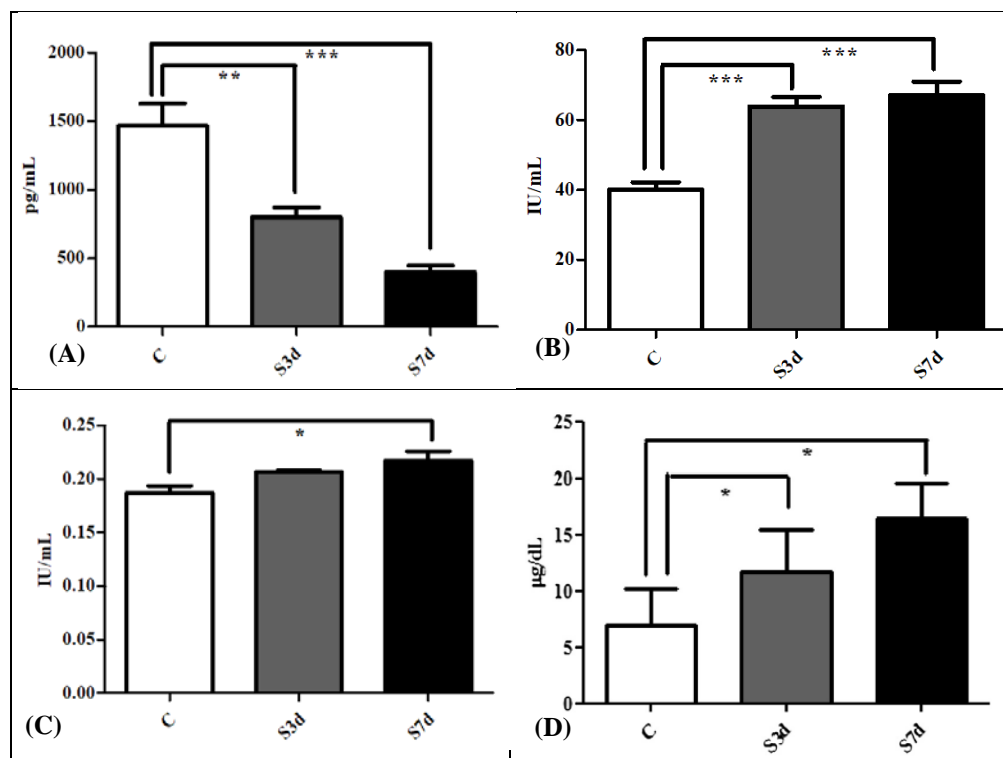


Fig. 46. Valorile 3-NT (A), CAT (B), GPX (C) și CS (D) la grupul Control și la loturile experimentale expuse stresului de imobilizare, timp de 3 respectiv 7 zile. Valorile sunt exprimate ca medie \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Toma și colab., 2017).

Din punct de vedere structural, colorația cu acridinorange a evidențiat o dinamică interesantă a celulelor gliale (**Fig. 48**). Astfel, de-a lungul perioadei de expunere, la stresul de imobilizare repetată, după 3 respectiv 7 zile de stres, în curbura ariei CA3 hipocampice s-a observat activarea unor celule (semnal puternic fluorescent dat de nucleul acestora), în raport de directă proporționalitate cu timpul de stres și cu variațiile stresului oxidativ și ale corticosteronului. În urma colorației Nissl (**Fig. 49**), arhitectura ariei CA3 din hipocamp nu a prezentat modificări, astfel că activarea acelor celule, observată în fluorescență, nu s-a suprapus cu nici o modificare la nivelul ariei CA3.

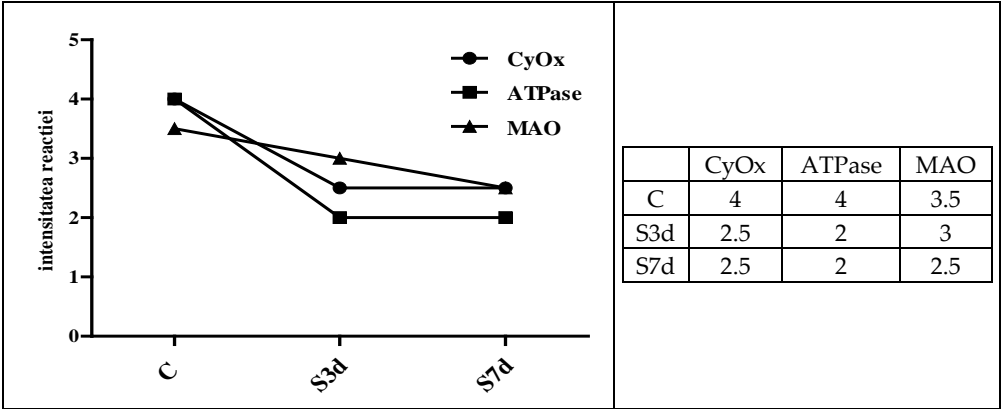


Fig. 47. Determinarea dinamicii CyOx, ATPazei și MAO la Control și la loturile experimentale. Graficul ilustrează efectul, dependent de timp, al stresului asupra funcției mitocondriale și a semnalizării serotoninerge evaluate prin intermediul histoenzimelor. Mediația serotoninergetică (MAO ca indicator al acesteia) s-a dovedit a fi mai consolidată decât enzimele mitocondriale CyOx, respectiv ATPază. Evaluarea reacției histochimice a fost efectuată după metoda lui Grover și colab. (2015): 4 – reacție foarte intensă; 3.5-3 – reacție intensă; 2.5 – reacție moderată; 2-1 – reacție slabă; 0 – reacție negativă.

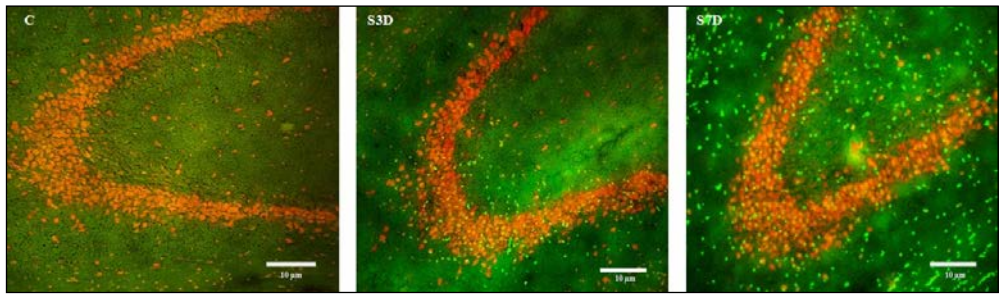


Fig. 48. Structura ariei CA3 hipocampice la Control (C) și la grupurile experimentale, în urma marcării acizilor nucleici cu acridinorange. Se observă activarea celulelor gliale, în jurul curburii ariei CA3, cu o rată proporțională cu timpul de expunere la stres. Col. Acridinorange, x 200 (Toma și colab., 2017).

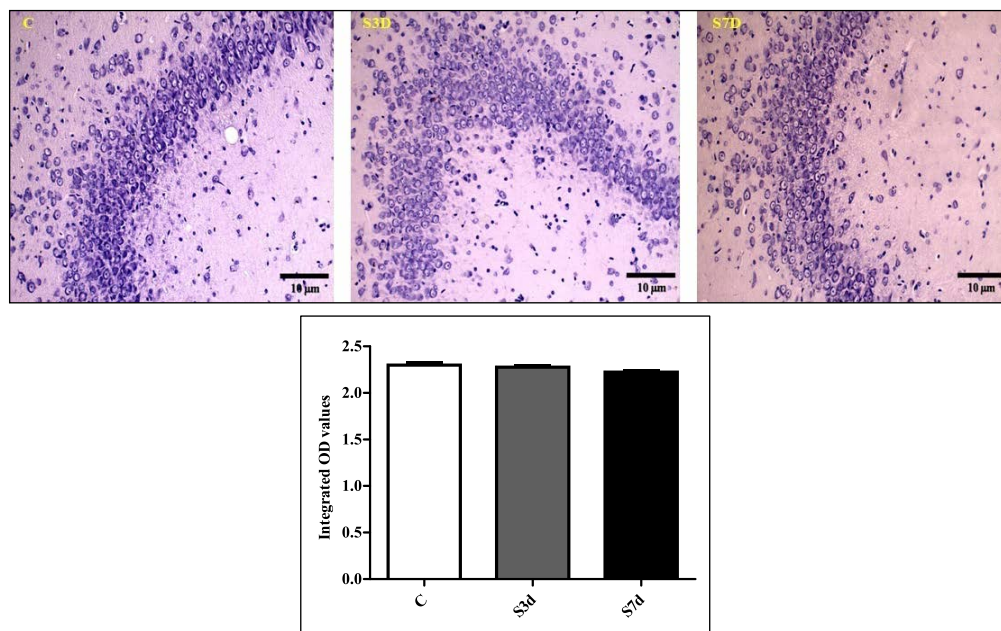


Fig. 49. Structura ariei CA3 hipocampice la Control (C) și la grupurile experimentale. Colorația Nissl demonstrează absența modificărilor în arhitectura ariei, în procesul neurosecretor sau sub aspectul morfologiei neuronale. Graficul reprezintă valorile medii ale densității optice integrate pentru colorația Nissl (filtru albastru-violet). Rezultatele măsurării densității optice integrate demonstrează absența modificărilor sub aspectul dinamicii substanței Nissl. Col. Nissl, $\times 200$ (Toma și colab., 2017).

Simpla activare a unor celule marcate cu acridinorange nu a condus spre o concluzie clară a tipului de celule care proliferază în curbura hipocampică. Colorația Nissl ar sugera că celulele, ale căror nuclei au fost marcați fluorescent, ar putea fi oligodendrocite sau microglia. Un studiu complementar, al ultrastructurii celulelor din zona analizată (**Fig. 50, Fig. 51, Fig. 52**), a condus spre concluzia că nucleii care au proliferat (fluorescența verde) au fost ai oligodendrocitelor, iar structura neuronilor ariei CA3 nu a prezentat modificări notabile. Aceste date de ultrastructură au susținut ipoteza formată cu privire la prezența/proliferarea oligodendrocitelor, în condiții de stres, iar funcția de balansare a neuronilor CA3 a fost, de asemenea, susținută (Toma și colab., 2017).

Absența unor modificări intracelulare asociate cu activarea oligodendrocitelor și cu modificări perineuronale specifice stresului au

arătat rolul de stress-buffer al ariei CA3 hipocampice. Studiile ulterioare au făcut obiectul unor experimente mai ample, în care s-a urmărit verificarea asumptiei bazată pe datele prezentate. Rolul ariei CA3 în mecanismele de *stress-buffering* face și în prezent un obiect al cercetărilor noastre.

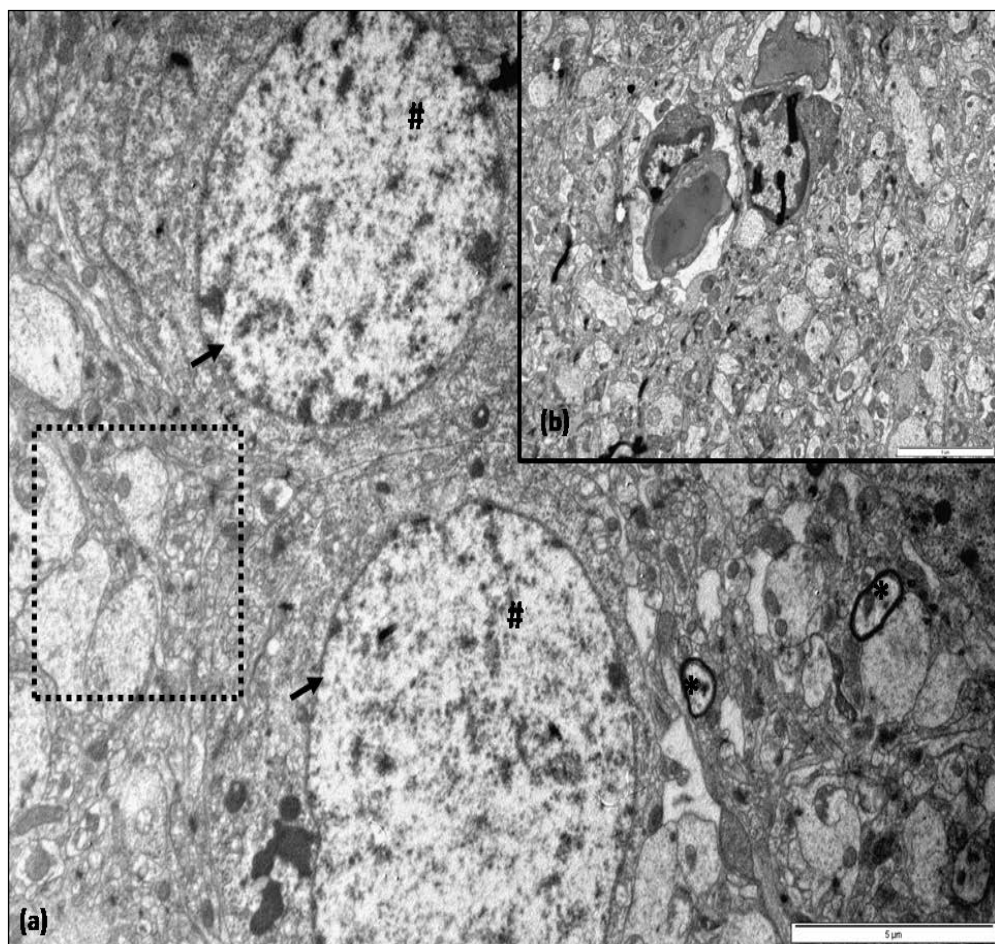


Fig. 50. Aspecte ultrastructurale la microscop electronic cu transmisie, ale neuronilor ariei CA3, la lotul Control. În subfigura (a) s-au remarcat nucleii neuronilor piramidali, înconjurați de citoplasmă bine organizată, cu reticul endoplasmatic normal, mitocondrii fără lize sau vacuolizări, teritoriul perinuclear neuronal având un aspect compact (chenarul punctat). Ușoare dilatări pericapilare (subfigura (b)) au fost, de asemenea, observate. Cromatina (#) a fost bine organizată, iar în jurul neuronilor s-au remarcat și componente mielinice (*) care reprezintă secțiuni prin axoni. x 5000.

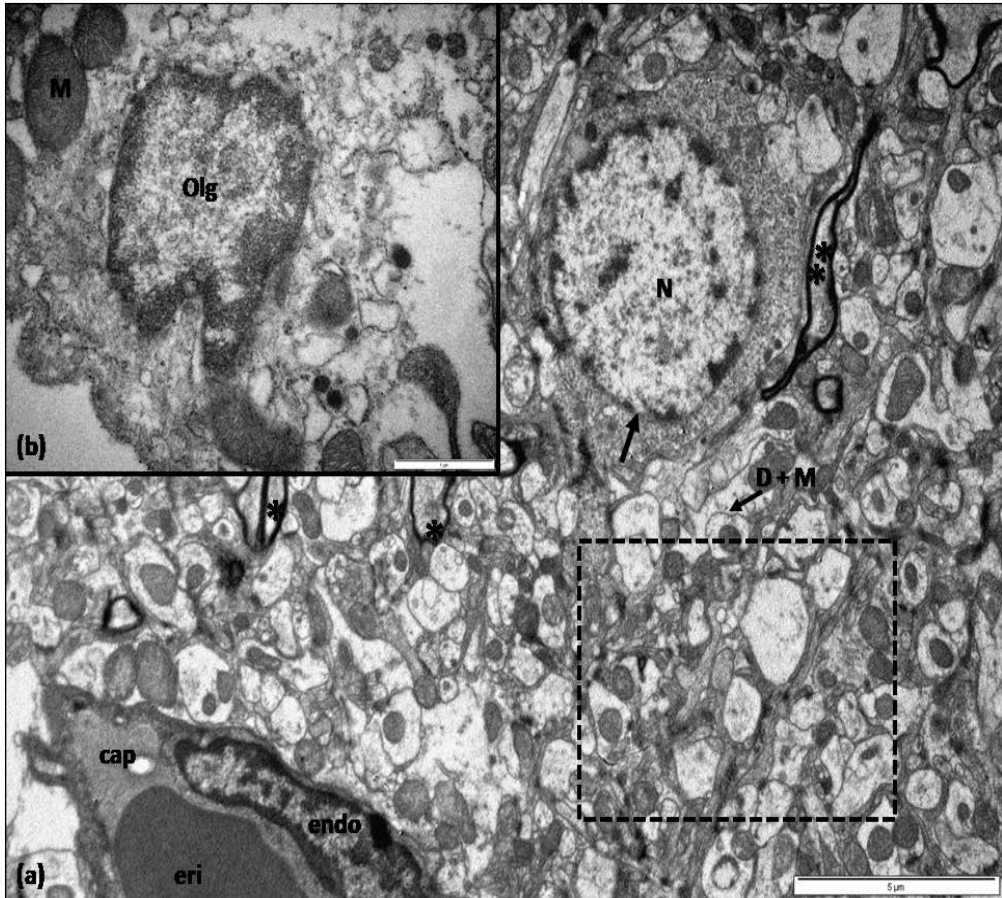


Fig. 51. Ultrastructura zonei CA3 hipocampice la lotul S3D (stres de 3 zile) la microscop electronic cu transmisie. S-a remarcat (subfigura (a)) structura normală a neuronului (săgeată neagră), cu nucleul normal organizat, cu mici ondulări ale anvelopei nucleare iar tangențial cu o secțiune printr-un axon, (*), s-a remarcat caracterul electrodens al mielinei. Dendritele (D) apar cu mitocondriile (M) adesea lizate (eveniment observat în analiza histoenzimologică), iar în jurul neuronilor s-a remarcat prezența oligodendrocitelor (Olg) (subfigura (b)) cu zone de liză citoplasmatică și mitocondrii normale. Neuropilul nu a prezentat spații lacunare (chenarul punctat). Perineuronal, s-au observat endoteliul vascular (endo), un capilar (cap), respectiv un eritrocit (eri). x 5000.

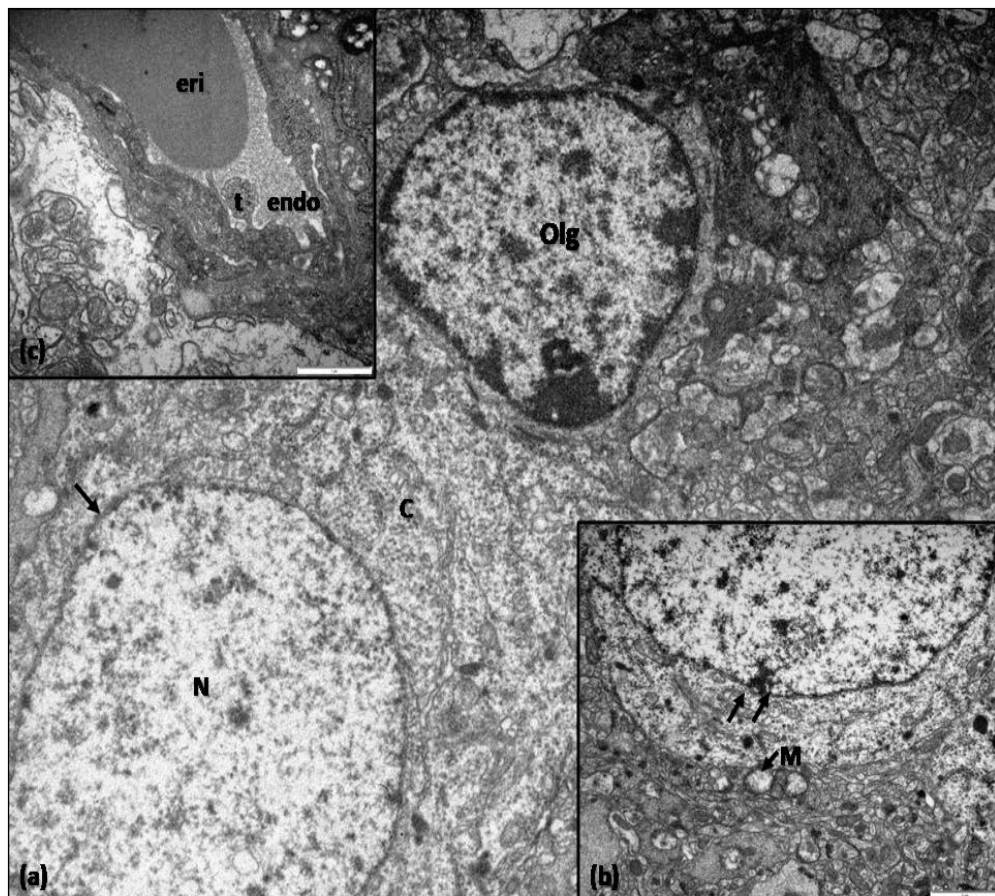


Fig. 52. Aspecte ultrastructurale ale ariei CA3 hipocampice la lotul S7D (animale stresate 7 zile) la microscop electronic cu transmisie. Morfologia neuronului (subfigura (a)) a prezentat o scădere a caracterului osmofil al acizilor nucleici, iar citoplasma s-a prezentat normală, fără dilatări ale reticulului endoplasmatic și fără spații lacunare. Lângă neuron, s-a remarcat prezența oligodendrocitului identificat după conturul pronunțat al nucleului cu heterocromatină (Olg). S-a remarcat, totodată, un contur ușor neregulat al nucleului neuronal (subfigura (b), săgeată neagră) și mitocondrii lizate (subfigura (b), M). Totodată, în urma stresului de imobilizare de 7 zile consecutive, la nivelul capilarelor sangvine s-au identificat trombocite aderente (subfigura (c), t – trombocit secționat transversal; endo – endoteliul capilar; eri – eritrocit).

7.4. Discuții

Stresul de imobilizare a generat, la rândul său, stres nitrooxidativ, după cum arată atât datele noastre, cât ale altor autori (Alkadhi, 2013; Chen și colab., 2015, 2016; Carda și colab., 2015). Interacțiunea NO sistemic (produs în acest caz de iNOS) cu radicalul superoxid conduce la formarea peroxinitritului, considerat toxic în special pentru neuroni. Peroxinitritul reacționează ireversibil cu resturile de tirozină ale proteinelor și formează 3-nitrotirozina (3-NT). Reactivitatea superoxidului cu NO, prin urmare inactivarea NO, a fost susținută de rezultatele experimentale care au demonstrat că superoxid-dismutaza stabilizează EDRF (endothelium - derived relaxing factor) (Gađek-Michalska și colab., 2012). Cu toate acestea, ipoteza noastră menționează că stresul de imobilizare scade nivelul sangvin al NO prin modularea iNOS. Aceste reacții ar putea conduce la scăderea 3-NT fără reacția cu NO a radicalilor superoxid (Toma și colab., 2017).

SOD, CAT și GPX scad nivelul ROS în sistemele biologice și generează apă. Datele noastre au demonstrat, în acord cu referințele menționate mai sus, că enzimele antioxidante au fost stimulate, iar stresul nitrooxidativ a fost scăzut în urma stresului de imobilizare repetată. Creșterea sangvină a CAT și GPX a confirmat prezența ROS, generate de perturbări ale funcției mitocondriale (ex. eliberarea de citocrom *c* din lanțul respirator mitocondrial), disfuncții endoteliale (ex. exprimarea anormală a eNOS) (Ukkola și colab., 2001; Alkadhi, 2013; Carda și colab., 2015). Nivelurile sangvine ale 3-NT, respectiv CAT și GPX, au sugerat că în stresul de imobilizare, sistemul nervos central eliberează gradual molecule care acționează direct asupra balanței redox (Toma și colab., 2017).

Creșterea concentrației sangvine a corticosteronului a fost puntea de legătură dintre stresul oxidativ evaluat și aspectele microscopice ale ariei CA3 hipocampice. După cum au arătat Carda și colab. (2015), creșterea nivelului sangvin al corticosteronului a generat stres oxidativ.

Glucocorticoizii au accelerat metabolismul celular pentru a genera energie necesară proceselor adaptative, procese care au lăsat în urmă radicali liberi (Leonardo, 1990; Spiers și colab., 2013). În acest context, mecanismul adaptativ (creșterea corticosteronului), în urma căruia se generează ROS, conduce la apariția unuia dintre puținele mecanisme de feed-back pozitiv, în care răspunsul stimulează comanda sau cauza care l-a generat. Generarea ROS a condus la stimularea stresului oxidativ și a inflamației care, din nou, vor solicita glucocorticoizi (Toma și colab., 2017). Variațiile ROS, generate în urma expunerii la stres de imobilizare repetată, au fost, în tandem, cu modificările activității CyOx și a ATPazei (scăderea acestora), corelate la rândul lor cu stresul oxidativ indus de corticosteron; și aceste modificări susțin cercul vicios existent între stresul neuropsihic – corticosteron – stres oxidativ. Mediația monoaminergică nu a fost influențată de stresul de imobilizare. Datele noastre sunt susținute de cercetările lui Steinhäuser și Gallo (1996), care au arătat că, în stresul neuropsihic, mediația glutamatergică a fost stimulată.

Din punct de vedere histologic, datele noastre susțin activarea celulelor gliale (oligodendrocitelor) în aria CA3 hipocampică, fără ca evenimentul adaptativ să influențeze structura și arhitectura neuronilor din cornul amonic 3. Relativ controversată, acțiunea corticosteronului asupra celulelor gliale a condus la stimularea și nu la inhibarea proliferării oligodendrocitelor, în cazul stresului neuropsihic, după cum au arătat studiile lui Bares (1997), Warringa și colab. (1987) și Czéh și Lucasen (2007). Absența modificărilor, în distribuția substanței Nissl, dar și în raport cu morfo-arhitectura neuronilor CA3, a sugerat că această subzonă a hipocampului reacționează la stresul neuropsihic prin mecanisme celulare complementare (activare oligodendrogliă) și umorale (corticosteron, radicali liberi) (Toma și colab., 2017).

Activarea glială a demonstrat un proces inflamator local (Deuker și colab., 2014), iar analiza ultrastructurală a evidențiat o serie de modificări notabile situate perineuronal, precum și prezența oligodendrocitelor în

număr mai mare, în proximitatea neuronilor. Astfel, subzona CA3 a hipocampului a jucat rolul unui releu fiziologic, care a balansat reacția la stresul de imobilizare repetată (Toma și colab., 2017).

7.5. Concluzii

Modelul biologic al stresului de imobilizare, ca model pentru stresul neuropsihic, a evidențiat un rol pe care hipocampul îl are în adaptarea la stresul nitrooxidativ și neuropsihic. Modelul biologic a relevat un mecanism de *stress-buffering* al ariei C3, pe care șobolanul Wistar l-a dezvoltat. Studiile aprofundate vor evidenția, prin prisma proprietății de *stress-buffering*, legătura dintre modificările prezentate și ecoul comportamental al expunerii repetate la stres.

8.

Convergența datelor experimentale spre căi fundamentale comune

(I) Folosirea *in vivo* a unor proteine prooxidante, alături de diverse molecule rezultate prin derivatizarea Hb sau Hr, a evidențiat: (i) reacția imună exclusiv umorală, apărută în urma expunerii la derivați ai Hb respectiv Hr; (ii) intersecția imunității umorale cu hemostaza via trombocite, fibrinogen și imunoglobuline, atunci când biosistemul identifică proteine specifice sângelui; (iii) modularea reactivității prooxidante a derivaților de Hb/Hr a condus la modularea efectelor fiziopatologice ale acestora; (iv) între stresul oxidativ și răspunsul inflamator sistemic există o relație de directă proporționalitate.

(II) Stresul oxidativ, asociat cu neuropatologii (tulburări de memorie, anxietate) sau cu modularea reacției imune, a demonstrat caracterul pleiomorf al reactivității modelului biologic folosit. S-a observat activitatea antioxidantă cerebrală a curcuminei, prin modularea căii de semnalizare mediată de NF- κ B, ERK1/2 și iNOS, după administrarea unei doze de diazepam (agentul care a destabilizat balanța redox cerebrală).

(III) În condiții normale, alicina a jucat un rol de stimulator al limfocitelor B, prin intermediul receptorului SCAR B1, a cărei cale de semnalizare s-a intersectat cu cea a BCR (B Cell Receptor), conducând la amplificarea secreției de imunoglobuline. În paralel, cu creșterea sintezei și eliberării imunoglobulinelor, stresul oxidativ a fost diminuat. Mai mult, o serie de date experimentale obținute de noi au demonstrat că, există relații de inversă sau directă proporționalitate între stresul oxidativ și

reacția inflamatorie sistemică, respectiv răspunsul imun mediat umoral. Modelul biologic, însă, a evidențiat caracterul polifactorial al stresului oxidativ și a demonstrat că, diferiți compuși destinați variatelor scheme de tratament, acționează după legi comune și, totodată, s-a constatat caracterul deosebit de dinamic și, adesea contradictoriu, al parametrilor stresului oxidativ

(IV) Testarea pe șobolanul de laborator a extractelor de *L. album* și *L. purpureum*, în condiții normale și de stres de imobilizare, a relevat multiple bioactivități de ordin protector și regulator ale acestora.

(V) Modelul biologic folosit a scos în evidență ordinea intrării în reacția defensivă a biosistemului model (șobolanul alb Wistar) prin intermediul reacțiilor adaptative (i) biochimice și (ii) tisulare. Modelul biologic a arătat, de asemenea, că organele asociate axei funcționale HHHS sunt în prima linie de reacție adaptativă, urmate de organele cu rol principal metabolic (ficat, rinichi). S-a putut observa bioactivitatea specifică a extractului de *L. album*, fundamentată pe prezența în extract a unor iridoide precum SME și ASME. Aceste iridoide au fost responsabile și de efectele regenerative ale extractului de *L. album* asupra girusului dentat.

(VI) În cazul testelor *in vivo*, pentru conturarea bioactivității specifice, extractul din fructe de merișor a semnalat o reacție atipică, în fitoterapie, însă esențială: un preparat fitofarmaceutic nu a avut efecte pozitive asupra anumitor organe și indicatori biochimici. Modelul biologic al steatohepatitei etanolice și a nefrotoxicității nespecifice a alcoolului etilic, la șobolanul alb din rasa Wistar, au evidențiat pleiomorfismul unui model biologic indus de un singur factor, în cazul nostru, etanolul.

(VII) Datele experimentale, ancorate în contextul experimental, au demonstrat că, modelul biologic utilizat pe șobolanul alb din rasa Wistar poate evidenția noi mecanisme fundamentale de acțiune a unui complex de fitocompuși (extractul vegetal). S-a remarcat efectul sinergic al extractului de *Galium verum* cu cel al stresului, în sensul stimulării

glandelor suprarenale. Per ansamblu, rezultatele studiului histologic al axei hipotalamus – adenohipofiză – glande suprarenale au demonstrat că administrarea extractului de *G. verum*, în condițiile expunerii animalelor la stres de imobilizare, a indus modificări morfologice importante la nivelul întregului ansamblu constitutiv al axei hipotalamo-hipofizo-suprarenaliene, rezultatele pledând în favoarea stimulării activității secretorii a acesteia.

(VIII) În cadrul modelului biologic al steatohepatitei nealcoolice, s-a putut observa că prezența antioxidanților dintr-un extract vegetal nu are *a priori* efecte benefice, matricea de administrare având un rol decisiv sub aspectul efectului biologic al extractului.

(IX) S-a remarcat, de asemenea, că steatohepatita indusă experimental cu CCl₄ a fost asociată cu creșterea răspunsului imun mediat celular și a TNF α . În plus, scăderea valorilor markerilor hepatici din ser nu reprezintă întotdeauna un semnal de regenerare hepatică. Uneori, ca și în cazul studiului nostru, scăderea markerilor hepatici sugerează gradul maxim de leziune, în urma căruia, ficatul nu mai deține rezerve enzimatice care, din cauza distrofiei grase și a necrozelor, sunt preluate de torentul sangvin local

(X) Modelul biologic utilizat, în vederea stabilirii acțiunii anxiolitice a extractelor de *Hypericum*, a relevat trei chestiuni esențiale: (i) antioxidanții pot avea efecte anxiolitice și antidepresive; (ii) reacția neuroimună din tulburarea anxioasă, a fost asociată cu creșterea stresului oxidativ; (iii) extractele de *Hypericum* prezintă proprietăți adjuvante (nu le considerăm terapeutice) în terapia anxiolitică.

(XI) În cazul modelului biologic folosit, în care, AgNP-CM au fost administrate în condiții normale, s-a remarcat, ca și în cazul studiilor cu alicină, plasticitatea structurală și metabolică a șobolanului alb Wistar. Totodată, prezența compușilor din *C. mas* a determinat stimularea acțiunii AgNP relevată de amplitudinea apoptozei și a leziunilor testiculare observate.

(XII) Modelul biologic al stresului de imobilizare, ca model pentru stresul neuropsihic, a evidențiat un nou rol pe care hipocampul îl are în adaptarea la stresul nitrooxidativ și neuropsihic. Modelul biologic a relevat un mecanism de *stress-buffering* al ariei CA3 pe care șobolanul Wistar l-a dezvoltat. Studiile aprofundate vor evidenția, prin prisma proprietății de *stress-buffering*, legătura dintre modificările prezentate și eoul comportamental al expunerii repetate la stres.

Modelele biologice în cadrul cărora s-au derulat cercetările noastre au avut ca numitor comun, biologia și patologia stresului oxidativ. Cercetările s-au derulat folosind modele experimentale ale diverselor condiții patologice (stres neuropsihic, tulburare anxioasă, intoxicație etilică, steatohepatită), sau șobolani albi Wistar cu status normal din punct de vedere fiziologic (testarea derivaților din Hb/Hr, a alicinei, curcuminei sau a noilor mecanisme implicate în adaptarea la stres neuropsihic). Elementele de convergență ale modelelor experimentale normale sau patologice, studiate pe șobolanul alb din rasa Wistar, cuprind:

(i) indiferent de statusul patologic al șobolanului supus experimentării, tabloul stresului oxidativ variază în timp;

(ii) scăderea sau creșterea stresului oxidativ nu se generalizează, ci este strict dependentă de contextul experimental;

(iii) modelele biologice normale (fără condiție patologică) reflectă bioactivitatea moleculei/compusului/extractului vegetal testat, într-o formă mai restrânsă decât testările efectuate cu modele biologice ale unor patologii, în care pentru molecula/compusul/extractul vegetal testat, se scot în evidență multiple implicații metabolice, structurale sau comportamentale;

(iv) alegerea modelului biologic nu se face după ce ar vrea experimentatorul să obțină, ci după specificul (caracterizare fizică, chimică, studii *in silico* sau după caz, *in vitro*) moleculei/ compusului/ extractului vegetal testat, față de care se așteaptă anumite efecte biologice;

(v) modelele biologice sunt sisteme funcționale pleiomorfe, care scot în evidență pleiomorfismul moleculei/compusului/extractului vegetal testat;

(vi) proporțional cu complexitatea modelului biologic și a analizelor efectuate, subiectul cercetat este susținut cu date multidimensionale (moleculare, metabolice, morfologice, de interacțiune în căile de semnalizare, comportamentale etc.), iar apropierea de adevărul științific este mai mare;

(vii) în reacția adaptativă, la anumiți factori perturbatori, există forme de adaptare, pe care le încadrăm în *forme adaptative tampon*, capabile să mențină balanța redox, metabolică etc. o perioadă definită de timp; după epuizarea acestor *coping buffered reactions*, biosistemul va declanșa mecanismul adaptativ propriu-zis (după cum s-a observat în Capitolul 7).

Postfață

Profesorilor, colegilor, colaboratorilor, prietenilor deopotrivă, le mulțumesc pentru suportul acordat în realizarea acestui material. Recunoștință și mulțumiri aduc colaboratorilor din Institutul de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca și celor din Facultatea de Biologie și Geologie respectiv Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică a Universității Babeș-Bolyai, pentru încrederea pe care au avut-o în ideile mele și au depus eforturi pentru evoluția mea. Lucrarea de față nu ar fi apărut fără colaborarea cu Catedra de Fiziologie a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca, disciplina de Fiziopatologie din cadrul Facultății de Medicină Veterinară – Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca, Laboratorul de Radiobiologie Tumorală al Institutului Oncologic „I. Chiricuță” Cluj-Napoca, Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare din Cluj-Napoca, alături de care am avut parte de experiențe academice deosebit de productive. *Eius memoria numquam perdentur!* A construi o încredere reciprocă, a lucra cu perspicacitate, gândire anticipativă, admirația biunivocă, rigurozitate științifică și a menține climatul calm de care este nevoie, sunt elemente definitorii, alături de pasiune, care contribuie la construcția omului de știință independent.

Datele experimentale expuse conturează aria în care un biosistem reacționează în condiții experimentale, stresul nitrooxidativ fiind un indicator extrem de dinamic al proceselor metabolice urmărite. Modelul experimental este în cadrul unui sistem viu, reactiv, mimetic și autoreglat, care răspunde specific în urma acțiunii diferiților factori perturbatori. Moleculele testate, respectiv extractele vegetale, se interpun în reacția

sistemică specifică modelului experimental, astfel, observându-se acțiunea acestora în funcție de direcția către care orientează șirul de reacții (moleculare, biochimice, morfologice, comportamentale) existente în biosistemul cercetat.

Referințe

- Abdel-Halim, R. E. (2005). Contributions of Ibn Zuhr (Avenzoar) to the progress of surgery: a study and translations from his book Al-Taisir, *Saudi Medical Journal*, 26(9):1333-1339.
- Abercrombie, H. C., Kalin, N. H., Thurow, M. E., Rosenkranz, M. A., & Davidson, R. J. (2003). Cortisol variation in humans affects memory for emotionally laden and neutral information. *Behavioral Neuroscience*, 117(3), 505-516.
- Abu-Taweel, G. M., Ajarem, J. S., & Ahmad, M. (2013). Protective effect of curcumin on anxiety, learning behavior, neuromuscular activities, brain neurotransmitters and oxidative stress enzymes in cadmium intoxicated mice. *Journal of Behavioral and Brain Science*, 3(01), 74.
- Adams, C. W. M., & Pearce, A. E. (1959). Classification of the mucoid (basophil) cells in the normal and pathological human adenohypophysis. *Journal of Endocrinology*, 18(2), 147-153.
- Ak, T., & Gülçin, İ. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions*, 174(1), 27-37.
- Akkol, E. K., Yalçın, F. N., Kaya, D., Çalış, İ., Yesilada, E., & Ersöz, T. (2008). In vivo anti-inflammatory and antinociceptive actions of some *Lamium* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 118(1), 166-172.
- Alayash, A. I., Patel, R. P., & Cashion, R. E. (2001). Redox reactions of hemoglobin and myoglobin: biological and toxicological implications. *Antioxidants and Redox Signaling*, 3(2), 313-327.
- Alayash, A.I. (2004). Oxygen therapeutics: can we tame haemoglobin? *Nature Reviews in Drug Discovery*, 3(2), 152.

- Alkadhi, K. (2013). Brain physiology and pathophysiology in mental stress. *ISRN Physiology*, 2013, 1-24.
- Alkadhi, K. (2013). Brain physiology and pathophysiology in mental stress. *ISRN Physiology*, 2013, 1-23.
- Allen, N. S. (1980). Interaction of phenolic anti-oxidants with hindered piperidine compounds: A spectrophotometric study. *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications*, 1(4), 235-241.
- Ameh, S. J., Obodozie, O. O., Inyang, U. S., Abubakar, M. S., & Garba, M. (2010). Current phytotherapy – A perspective on the science and regulation of herbal medicine. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2), 072-081.
- Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E., & Hochstein, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(11), 6858-6862.
- Angulo, M. C., Kozlov, A. S., Charpak, S., & Audinat, E. (2004). Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 24(31), 6920-6927.
- Aoki, Y., Sato, H., Nishimura, N., Takahashi, S., Itoh, K., & Yamamoto, M. (2001). Accelerated DNA adduct formation in the lung of the Nrf2 knockout mouse exposed to diesel exhaust. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 173(3), 154-160.
- Archana, J. S., Paul, R., & Tiwari, A. (2011). Indian Medicinal Plants: A rich source of natural immuno modulator. *International Journal of Pharmacology*, 7(2), 198-205.
- Arendt, H. (2018). Viața spiritului, Editura Humanitas, București, 25-31.
- Ariga, T., & Hamano, M. (1990). Radical scavenging action and its mode in procyanidins B-1 and B-3 from azuki beans to peroxy radicals. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(10), 2499-2504.
- Arkosi, M., Scurtu, F., Vulpoi, A., Silaghi-Dumitrescu, R., & Kurtz Jr, D. (2017). Copolymerization of recombinant *Phascolopsis gouldii*

- hemerythrin with human serum albumin for use in blood substitutes. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(2), 218-223.
- Arnaud, F., Scultetus, A. H., Haque, A., Saha, B., Kim, B., Auken, C., ... & Freilich, D. (2012). Sodium nitroprusside ameliorates systemic but not pulmonary HBOC-201-induced vasoconstriction: an exploratory study in a swine controlled haemorrhage model. *Resuscitation*, 83(8), 1038-1045.
- Arredouani, M. S. (2014). Is the scavenger receptor MARCO a new immune checkpoint?. *Oncoimmunology*, 3(10), e955709.
- Arredouani, M. S. (2014). Is the scavenger receptor MARCO a new immune checkpoint?. *Oncoimmunology*, 3(10), e955709.
- Arreola, R., Quintero-Fabián, S., López-Roa, R. I., Flores-Gutiérrez, E. O., Reyes-Grajeda, J. P., Carrera-Quintanar, L., & Ortuño-Sahagún, D. (2015). Immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic compounds. *Journal of Immunology Research*, 2015, 1-13.
- Arsić, I., Žugić, A., Tadić, V., Tasić-Kostov, M., Mišić, D., Primorac, M., & Runjaić-Antić, D. (2012). Estimation of dermatological application of creams with St. John's Wort oil extracts. *Molecules*, 17(1), 275-294.
- Asada, K., & Kanematsu, S. (1976). Reactivity of thiols with superoxide radicals. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40(9), 1891-1892.
- Atmaca, H. (2018). Effects of *Galium aparine* extract on the angiogenic cytokines and ERK1/2 proteins in human breast cancer cells. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 14(1), 171-179.
- Atmaca, H., Bozkurt, E., Cittan, M., & Tepe, H. D. (2016). Effects of *Galium aparine* extract on the cell viability, cell cycle and cell death in breast cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 186, 305-310.
- Baek, J. H., Zhou, Y., Harris, D. R., Schaer, D. J., Palmer, A. F., & Buehler, P. W. (2012). Down selection of polymerized bovine hemoglobins for use as oxygen releasing therapeutics in a guinea pig model. *Toxicological Sciences*, 127(2), 567-581.

- Bailly, X., Vanin, S., Chabasse, C., Mizuguchi, K., & Vinogradov, S. N. (2008). A phylogenomic profile of hemerythrins, the nonheme diiron binding respiratory proteins. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 244, 1-10.
- Baker, J. T., Borris, R. P., Carté, B., Cordell, G. A., Soejarto, D. D., Cragg, G. M., ... & Tyler, V. E. (1995). Natural product drug discovery and development: new perspectives on international collaboration. *Journal of Natural Products*, 58(9), 1325-1357.
- Barres, B. A., Lazar, M. A., & Raff, M. C. (1994). A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development*, 120(5), 1097-1108.
- Barres, B. A., Lazar, M. A., & Raff, M. C. (1994). A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development*, 120(5), 1097-1108.
- Baytop, T. (1999). Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present), 2nd Ed., Nobel Tıp Kitabevi, Istanbul, Turkey, p. 163.
- Bernard, C. (1957). *An introduction to the study of experimental medicine* (Vol. 400). Courier Corporation, London, p. 155-156.
- Bernard, C. (1958). Introducere în studiul medicinei experimentale, Editura Științifică, București, p. 158.
- Bigoniya, P., & Shukla, A. K. (2015). Nootropic efficacy of *Euphorbia thymifolia* Linn phytosterol on mice. *International Journal of Phytotherapy*, 5(1), 22-32.
- Bishayi, B.; Roychowdhury, S.; Ghosh, S.; Sengupta, M. (2002). Hepatoprotective and immunomodulatory properties of *Tinospora cordifolia* in CCl₄ intoxicated mature albino rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 27(3), 139-146.
- Bladt, S., & Wagner, H. (1994). Inhibition of MAO by fractions and constituents of hypericum extract. *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, 7(1), 57-59.

- Blaschek, W., Hänsel, R., Keller, K., Reichling, J., Rimpler, H., & Schneider, G. (Eds.). (2013). *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis: Folgeband 2: Drogen AK*. Springer-Verlag.
- Blumenthal M (ed)., (1998). The German Commission E Monographs. Austin, Texas: American Botanical Council. pp. 228-229; 382.
- Borlinghaus J., Albrecht F., Gruhlke M.C.H., Nwachukwu I.D. & Slusarenko A.J. (2014). Allicin: chemistry and biological properties, *Molecules*, 19, 12591-12618.
- Bouayed, J., Rammal, H., & Soulimani, R. (2009). Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(2), 63-67.
- Bradic, J., Petkovic, A., & Tomovic, M. (2018). Phytochemical and Pharmacological Properties of Some Species of the Genus *Galium* L. *Galium verum* and *mollugo*. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, 1(1), 1-7.
- Braun, S., Hanselmann, C., Gassmann, M. G., auf dem Keller, U., Born-Berclaz, C., Chan, K., ... & Werner, S. (2002). Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Molecular and Cellular Biology*, 22(15), 5492-5505.
- Brenner, R., Azbel, V., Madhusoodanan, S., & Pawlowska, M. (2000). Comparison of an extract of hypericum (LI 160) and sertraline in the treatment of depression: a double-blind, randomized pilot study. *Clinical Therapeutics*, 22(4), 411-419.
- Breyer, K. E., Getchell, R. G., Cornwell, E. R., Wooster, G. A., Ketola, H. G., & Bowser, P. R. (2015). Efficacy of an extract from garlic, *Allium sativum*, against infection with the furunculosis bacterium, *Aeromonas salmonicida*, in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 46(3), 273-282.
- Brian, E.L. (1997). Stress and the Immune System: Immunological Aspects of Depressive Illness in Stress, in: Brian, E.L., Miller K., (Eds.),

- Immune System and Psychiatry, Jhon Wiley & Sons Ltd., West Sussex, pp. 113-136.
- Bridi, H., de Carvalho Meirelles, G., & von Poser, G. L. (2018). Structural diversity and biological activities of phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species. *Phytochemistry*, 155, 203-232.
- Bringas, M., Petruk, A. A., Estrin, D. A., Capece, L., & Martí, M. A. (2017). Tertiary and quaternary structural basis of oxygen affinity in human hemoglobin as revealed by multiscale simulations. *Scientific Reports*, 7(1), 10926.
- Brown, D. W., Graupner, P. R., Sainsbury, M., & Shertzer, H. G. (1991). New antioxidants incorporating indole and indoline chromophores. *Tetrahedron*, 47(25), 4383-4408.
- Buehler, P. W., D'Agnillo, F., & Schaer, D. J. (2010). Hemoglobin-based oxygen carriers: from mechanisms of toxicity and clearance to rational drug design. *Trends in Molecular Medicine*, 16(10), 447-457.
- Bugajski, J., Gądek-Michalska, A., & Bugajski, A. J. (2004). Nitric oxide and prostaglandin systems. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 55(4), 679-703.
- Bujor, A., Miron, A., Luca, S. V., Skalicka-Wozniak, K., Silion, M., Ancuceanu, R., ... & Totoson, P. (2019). Metabolite profiling, arginase inhibition and vasorelaxant activity of *Cornus mas*, *Sorbus aucuparia* and *Viburnum opulus* fruit extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 133, 110764.
- Burger, O., Ofek, I., Tabak, M., Weiss, E. I., Sharon, N., & Neeman, I. (2000). A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 29(4), 295-301.
- Butterweck, V., Wall, A., Liefländer-Wulf, U., Winterhoff, H., & Nahrstedt, A. (1997). Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry*, 30(2), 117-124.

- Buynitsky, T., & Mostofsky, D. I. (2009). Restraint stress in biobehavioral research: recent developments. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 33(7), 1089-1098.
- Buynitsky, T., Mostofsky, D.I. (2009). Restraint stress in biobehavioral research: recent developments. *Neuroscience and Biobehavior Research*, 33 (7), 1089-1098.
- Cabelli, D. E., & Bielski, B. H. (1983). Kinetics and mechanism for the oxidation of ascorbic acid/ascorbate by HO₂/O₂⁻(hydroperoxyl/superoxide) radicals. A pulse radiolysis and stopped-flow photolysis study. *The Journal of Physical Chemistry*, 87(10), 1809-1812.
- Candelario-Jalil, E., & Fiebich, B. L. (2008). Cyclooxygenase inhibition in ischemic brain injury. *Current Pharmaceutical Design*, 14(14), 1401-1418.
- Carda, A. P., Marchi, K. C., Rizzi, E., Mecawi, A. S., Antunes-Rodrigues, J., Padovan, C. M., & Tirapelli, C. R. (2015). Acute restraint stress induces endothelial dysfunction: role of vasoconstrictor prostanoids and oxidative stress. *Stress*, 18(2), 233-243.
- Carda, A.P.P., Marchi, K.C., Rizzi, E., Mecawi, A.S., Rodrigues, J.A., Padovan, C.M. & Tirrapeli, C.R. (2015). Acute restraint stress induces endothelial dysfunctions: role of vasoconstrictions prostanoids and oxidative stress. *Stress*, 18(2), 233-243.
- Chakravarthi, K. K., & Avadhani, R. (2013). Beneficial effect of aqueous root extract of *Glycyrrhiza glabra* on learning and memory using different behavioral models: An experimental study. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 4(2), 420.
- Chan, J. Y., Cheung, M. C., Moi, P., Chan, K., & Kan, Y. W. (1995). Chromosomal localization of the human NF-E2 family of bZIP transcription factors by fluorescence in situ hybridization. *Human Genetics*, 95(3), 265-269.

- Chan, K., Han, X. D., & Kan, Y. W. (2001). An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8), 4611-4616.
- Chanas, S. A., Jiang, Q., McMahon, M., McWalter, G. K., McLellan, L. I., Elcombe, C. R., ... & Yamamoto, M. (2002). Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. *Biochemical Journal*, 365(2), 405-416.
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*, 59(3), 527-605.
- Chen, H. J. C., Spiers, J. G., Sernia, C., & Lavidis, N. A. (2015). Response of the nitregric system to activation of the neuroendocrine stress axis. *Frontiers in neuroscience*, 9, 3.
- Chen, H. J. C., Spiers, J. G., Sernia, C., & Lavidis, N. A. (2016). Acute restraint stress induces specific changes in nitric oxide production and inflammatory markers in the rat hippocampus and striatum. *Free Radical Biology and Medicine*, 90, 219-229.
- Chen, H. J. C., Spiers, J. G., Sernia, C., & Lavidis, N. A. (2016). Acute restraint stress induces specific changes in nitric oxide production and inflammatory markers in the rat hippocampus and striatum. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 90, 219-229.
- Chen, W., Qi, J., Feng, F., Bao, G., Wang, T., Xiang, M., & Xie, W. F. (2014). Neuroprotective effect of allicin against traumatic brain injury via Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway-mediated anti-inflammatory and anti-oxidative activities. *Neurochemistry International*, 68, 28-37.
- Chevallier A. (1996). The Encyclopedia of Medical Plants, DK- New-York, p. 112.

- Christian, K. M., Miracle, A. D., Wellman, C. L., & Nakazawa, K. (2011). Chronic stress-induced hippocampal dendritic retraction requires CA3 NMDA receptors. *Neuroscience*, 174, 26-36.
- Chudnicka, A., & Matysik, G. (2005). Research of enzymatic activities of fresh juice and water infusions from dry herbs. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(2), 281-286.
- Chukarina, E. V., Vlasov, A. M., & Eller, K. I. (2007). Quantitative determination of arbutin and hydroquinone in leaves of *Arctostaphylos*, *Vaccinium vitis-idaea*, and the plant preparations. *Voprosy Pitaniia*, 76(3), 82-87.
- Ciocârlan, V. (2000). Flora ilustrată a României, Ed. Ceres București, 738-747.
- Colín-González, A.L., Ortiz-Plata, A., Villeda-Hernández, J., Barrera, D., Molina-Jijón, E., Pedraza-Chaverri, J., & Maldonado, P.D. (2011). Aged garlic extract attenuates cerebral damage and cyclooxygenase-2 induction after ischemia and reperfusion in rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(4), 348-354.
- Concerto, C., Boo, H., Hu, C., Sandilya, P., Krish, A., Chusid, E., ... & Battaglia, F. (2018). *Hypericum perforatum* extract modulates cortical plasticity in humans. *Psychopharmacology*, 235(1), 145-153.
- Conti, M., Morand, P. C., Levillain, P., & Lemonnier, A. (1991). Improved fluorometric determination of malonaldehyde. *Clinical chemistry*, 37(7), 1273-1275.
- Cooper, M. D., Gabrielsen, A. E., & Good, R. A. (1967). Role of the thymus and other central lymphoid tissues in immunological disease. *Annual Review of Medicine*, 18(1), 113-138.
- Cork, S.C, Richards, J.E., Holt, M.K., Gribble, F.M., Reinan, F. & Trapp, S. (2015). Distribution and characterisation of glucagon-like peptide 1 receptor expressing cells in the mouse brain. *Molecular Metabolism*, 4, 718-731.
- Crăciun F., Bojor O., Alexan M. (1997). Farmacia naturii, vol II, Ed. Ceres, București, 153-154.

- Craciun, C., & Barbu-Tudoran, L. (2013). Identification of new structural elements within 'porosomes' of the exocrine pancreas: a detailed study using high-resolution electron microscopy. *Micron*, 44, 137-142.
- Crisan, D., Scharffetter-Kochanek, K., Crisan, M., Schatz, S., Hainzl, A., Olenic, L., ... & Sindrilaru, A. (2018). Topical silver and gold nanoparticles complexed with *Cornus mas* suppress inflammation in human psoriasis plaques by inhibiting NF- κ B activity. *Experimental Dermatology*, 27(10), 1166-1169.
- Crooke, A. C. (1935). Change in the basophil cells of the pituitary gland common to conditions which exhibit the syndrome attributed to basophil adenoma. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 41(2), 339-349.
- Czéh, B., & Lucassen, P. J. (2007). What causes the hippocampal volume decrease in depression?. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 257(5), 250-260.
- Czerwińska, M. E., & Melzig, M. F. (2018). *Cornus mas* and *Cornus officinalis*—coincidences and differences of two medicinal plants traditionally used. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 894.
- Dahl, T. A., Midden, W. R., & Hartman, P. E. (1988). Some prevalent biomolecules as defenses against singlet oxygen damage. *Photochemistry and photobiology*, 47(3), 357-362.
- Dairam, A., Fogel, R., Daya, S., & Limson, J. L. (2008). Antioxidant and iron-binding properties of curcumin, capsaicin, and S-allylcysteine reduce oxidative stress in rat brain homogenate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3350-3356.
- Daniel, K. (1935). Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) bei psychischen Störungen. *Hippokrates*, 10, 929-932.
- Darwish, R. S., Amiridze, N., & Aarabi, B. (2007). Nitrotyrosine as an oxidative stress marker: evidence for involvement in neurologic

- outcome in human traumatic brain injury. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 63(2), 439-442.
- Deac, F., Iacob, B., Fischer-Fodor, E., Damian, G., & Silaghi-Dumitrescu, R. (2011). Derivatization of haemoglobin with periodate-generated reticulation agents: Evaluation of oxidative reactivity for potential blood substitutes. *The Journal of Biochemistry*, 149(1), 75-82.
- Demirci, T. & Ozbek. E. (2009). Effects of stress on kidney: a histochemical study on rat model. *Endocrine Abstracts*, 20, P504.
- Demirezer, L.Ö., Gürbüz, F., Güvenalp, Z., Ströch, K., & Zeeck, A. (2006). Iridoids, flavonoids and monoterpene glycosides from *Galium verum* subsp. *verum*. *Turkish Journal of Chemistry*, 30(4), 525-534.
- Dennington, R.; Keith, T.A.; Millam, J.M. GaussView, SemichemInc., Version 5.0, Available online: <https://gaussian.com/gaussview6/> (Accessed on 27 November 2018)
- Deuker, L., Doeller, C., Fell, J., & Axmacher, N. (2014). Human neuroimaging studies on the hippocampal CA3 region—integrating evidence for pattern separation and completion. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 64.
- Dey, P.; Saha, M. R.; Sen, A. (2013). An overview on drug-induced hepatotoxicity. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(4), 1-4.
- Dinarello, C. A. (2000). The role of the interleukin-1–receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *New England Journal of Medicine*, 343(10), 732-734.
- Dinda, B., Kyriakopoulos, A. M., Dinda, S., Zoumpourlis, V., Thomaidis, N. S., Velegraki, A., ... & Dinda, M. (2016). *Cornus mas* L.(cornelian cherry), an important European and Asian traditional food and medicine: Ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology for its commercial utilization in drug industry. *Journal of Ethnopharmacology*, 193, 670-690.

- Ding, W. X.; Li, M.; Chen, X.; Ni, H. M.; Lin, C. W.; Gao, W., ... & Yin, X. M. (2010). Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice. *Gastroenterology*, 139(5), 1740-1752.
- Doba, T., Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1985). Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 835(2), 298-303.
- Doğan, Ş., Gökalsın, B., Şenkardes, İ., Doğan, A., & Sesal, N. C. (2019). Anti-quorum sensing and anti-biofilm activities of *Hypericum perforatum* extracts against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 235, 293-300.
- Dong, S.; Chen, Q. L.; Song, Y. N.; Sun, Y.; Wei, B.; Li, X. Y.; Su, S. B. (2016). Mechanisms of CCl₄-induced liver fibrosis with combined transcriptomic and proteomic analysis. *The Journal of Toxicological Sciences*, 41(4), 561-572.
- Duman, H. (2000). *Lamium* L. In: Guner, A., Ozhatay, N., Ekim, T., Baser, K.H.C. (Eds.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol. 11 (2). University Press, Edinburgh, UK, pp. 199–200.
- Edrada-Ebel, R., Ævarsson, A., Polymenakou, P., Hentschel, U., Carettoni, D., Day, J., ... & McNeil, B. (2018). SeaBioTech: from seabed to test-bed: harvesting the potential of marine biodiversity for industrial biotechnology. In *Grand Challenges in Marine Biotechnology* (pp. 451-504). Springer, Cham.
- Ellenberger, T. (1994). Getting a grip in DNA recognition: structures of the basic region leucine zipper, and the basic region helix-loop-helix DNA-binding domains. *Current Opinions in Structural Biology*, 4(1), 12–21.
- El-Sherbiny, D. A., Khalifa, A. E., Attia, A. S., & Eldenshary, E. E. D. S. (2003). *Hypericum perforatum* extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by

- amnesic dose of scopolamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 76(3-4), 525-533.
- Enomoto, A., Itoh, K., Nagayoshi, E., Haruta, J., Kimura, T., O'Connor, T., ... & Yamamoto, M. (2001). High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicological Sciences*, 59(1), 169-177.
- Ersoy, N., Bagci, Y., & Gok, V. (2011). Antioxidant properties of 12 cornelian cherry fruit types (*Cornus mas* L.) selected from Turkey. *Scientific Research and Essays*, 6(1), 98-102.
- Eshaghi, M., Zare, S., Banihabib, N., Nejati, V., Farokhi, F., & Mikaili, P. (2012). Cardioprotective effect of *Cornus mas* fruit extract against carbon tetrachloride induced-cardiotoxicity in albino rats. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*, 2(11), 11106-11114.
- Evenson, D. P., Jost, L. K., Baer, R. K., Turner, T. W., & Schrader, S. M. (1991). Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reproductive Toxicology*, 5(2), 115-125.
- Evenson, D., & Darzynkiewicz, Z. (1990). Acridine orange-induced precipitation of mouse testicular sperm cell DNA reveals new patterns of chromatin structure. *Experimental Cell Research*, 187(2), 328-334.
- Faissner, A., Heck, N., Dobbertin, A., & Garwood, J. (2006). DSD-1-Proteoglycan/Phosphacan and receptor protein tyrosine phosphatase-beta isoforms during development and regeneration of neural tissues. In *Brain Repair* (pp. 25-53). Springer, Boston, MA.
- Farcaș, A. D., Moț, A. C., Pârvu, A. E., Toma, V. A., Popa, M. A., Mihai, M. C., ... & Pârvu, M. (2019). In vivo pharmacological and anti-inflammatory evaluation of xerophyte *Plantago sempervirens* Crantz. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1-13.

- Feijoo-Siota, L., Rama, J. L. R., Sánchez-Pérez, A., & Villa, T. G. (2018). Expression, activation and processing of a novel plant milk-clotting aspartic protease in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 268, 28-39.
- Fernandes, M. S., Rissi, T. T., Zuravski, L., Mezzomo, J., Vargas, C. R., Folmer, V., ... & Puntel, R. L. (2014). Oxidative stress and labile plasmatc iron in anemic patients following blood therapy. *World Journal of Experimental Medicine*, 4(3), 38.
- Ferreira, S. S., Passos, C. P., Madureira, P., Vilanova, M., & Coimbra, M. A. (2015). Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 132, 378-396.
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 73(4), 1907-1916.
- Fischer-Fodor, E., Mot, A., Deac, F., Arkosi, M., & Silaghi-Dumitrescu, R. (2011). Towards hemerythrin-based blood substitutes: Comparative performance to hemoglobin on human leukocytes and umbilical vein endothelial cells. *Journal of biosciences*, 36(2), 215-221.
- Gądek-Michalska, A., Tadeusz, J., Rachwalska, P., Spyрка, J., & Bugajski, J. (2012). Effect of repeated restraint on homotypic stress-induced nitric oxide synthases expression in brain structures regulating HPA axis. *Pharmacological Reports*, 64(6), 1381-1390.
- Galoyan, A. (2000). Neurochemistry of brain neuroendocrine immune system: signal molecules. *Neurochemical research*, 25(9-10), 1343-1355.
- Galoyan, A. A. (2004). Discovery of new neurosecretory cytokines: Proline-rich peptides produced by n. paraventricularis and n. supraopticus of hypothalamus. In *Brain Neurosecretory Cytokines* (pp. 13-32). Springer, Boston, MA.
- Galoyan, A. A. (2012). Brain Neuroendocrine Immune System: Neurosecretion of Interleukins and New Cytokines Produced by NSO and NPV of Hypothalamus. In *Brain Immune System Signal*

- Molecules in Protection from Aerobic and Anaerobic Infections* (pp. 25-39). Springer, New York, NY.
- Ganji, A., Salehi, I., Sarihi, A., Shahidi, S., & Komaki, A. (2017). Effects of *Hypericum scabrum* extract on anxiety and oxidative stress biomarkers in rats fed a long-term high-fat diet. *Metabolic Brain Disease*, 32(2), 503-511.
- Ganji-Arjenaki, M., & Rafieian-Kopaei, M. (2019). Phytotherapies in inflammatory bowel disease. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 24, 42.
- Gastpar, M. (2013). *Hypericum* extract WS® 5570 for depression—an overview. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice*, 17(1), 1-7.
- Ghosal, S., Myers, B. & Herman, J.P. (2013). Role of central glucagon-like peptide 1 in stress. *Physiology & Behavior*, 122, 201-207.
- Gilabert-Juan, J., Castillo-Gomez, E., Pérez-Rando, M., Moltó, M. D., & Nacher, J. (2011). Chronic stress induces changes in the structure of interneurons and in the expression of molecules related to neuronal structural plasticity and inhibitory neurotransmission in the amygdala of adult mice. *Experimental Neurology*, 232(1), 33-40.
- Gilbey, M. P., & Spyer, K. M. (1993). Essential organization of the sympathetic nervous system. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 7(2), 259-278.
- Gîrd, C. E., & Florea, O. (2006). Pharmacognostic researches on *Galium verum* L. *Farmacia-București*, 54(2), 94.
- Gonzalez-Lima, F., & Cada, A. (1998). Quantitative histochemistry of cytochrome oxidase activity. In *Cytochrome oxidase in neuronal metabolism and Alzheimer's disease* (pp. 55-90). Springer, Boston, MA.
- Gould, S. A., Moore, E. E., Hoyt, D. B., Burch, J. M., Haenel, J. B., Garcia, J., ... & Moss, G. S. (1998). The first randomized trial of human polymerized hemoglobin as a blood substitute in acute trauma and emergent surgery. *Journal of the American College of Surgeons*, 187(2), 113-120.

- Graeber, M.B. & Streit, W.J. (2010). Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 89-105.
- Graf, E., Empson, K. L., & Eaton, J. W. (1987). Phytic acid. A natural antioxidant. *Journal of Biological Chemistry*, 262(24), 11647-11650.
- Griesemer, A. D., Sorenson, E. C., & Hardy, M. A. (2010). The role of the thymus in tolerance. *Transplantation*, 90(5), 465.
- Grigorescu E., Ciulei I., Stănescu U. (1986). Index fitoterapeutic. Ed. Medicală București, 25-36.
- Grillo, C. A., Risher, M., Macht, V. A., Bumgardner, A. L., Hang, A., Gabriel, C., ... & Reagan, L. P. (2015). Repeated restraint stress-induced atrophy of glutamatergic pyramidal neurons and decreases in glutamatergic efflux in the rat amygdala are prevented by the antidepressant agomelatine. *Neuroscience*, 284, 430-443.
- Grissom, N., & Bhatnagar, S. (2009). Habituation to repeated stress: get used to it. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(2), 215-224.
- Grover, J., Patel, P. N., Carnelio, S., Chandrashekar, C., Shergill, A. K., & Solomon, M. C. (2015). Comparison of glycogen content, basement membrane integrity and mitotic index in stages of oral dysplasia progression to cancer and in oral lichen-lichenoid reactions: a histochemical study. *Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research*, 3(3), 3-8.
- Grundmann, O., Lv, Y., Kelber O, Butterweck, V. (2010). Mechanism of St. John's wort extract (STW3-VI) during chronic restraint stress is mediated by the interrelationship of the immune, oxidative defense, and neuroendocrine system. *Neuropharmacology*, 58, 767-73.
- Gulati, A., & Sen, A. P. (1998). Dose-dependent effect of diaspirin cross-linked hemoglobin on regional blood circulation of severely hemorrhaged rats. *Shock (Augusta, Ga.)*, 9(1), 65-73.
- Gülçin, I., Beydemir, Ş., Şat, G., & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2005). Evaluation of antioxidant activity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *Acta Alimentaria*, 34(2), 193-202.

- Guo, H., Cui, H., Jin, H., Yan, Z., Ding, L., & Qin, B. (2015). Potential allelochemicals in root zone soils of *Stellera chamaejasme* L. and variations at different geographical growing sites. *Plant Growth Regulation*, 77(3), 335-342.
- Hagen, S. F., Borge, G. I. A., Bengtsson, G. B., Bilger, W., Berge, A., Haffner, K., & Solhaug, K. A. (2007). Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh., cv. Aroma): Effect of postharvest UV-B irradiation. *Postharvest Biology and Technology*, 45(1), 1-10.
- Haghi, M. E., Dehghan, G., Banihabib, N., Zare, S., Mikaili, P., & Panahi, F. (2014). Protective effects of *Cornus mas* fruit extract on carbon tetrachloride induced nephrotoxicity in rats. *Indian Journal of Nephrology*, 24(5), 291.
- Hannum, S. M. (2004). Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(1), 1-17.
- Hassanpour, H., Yousef, H., Jafar, H., & Mohammad, A. (2011). Antioxidant capacity and phytochemical properties of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) genotypes in Iran. *Scientia Horticulturae*, 129(3), 459-463.
- Hathazi, D., Mot, A. C., Vaida, A., Scurtu, F., Lupan, I., Fischer-Fodor, E., ... & Silaghi-Dumitrescu, R. (2014). Oxidative protection of hemoglobin and hemerythrin by cross-linking with a nonheme iron peroxidase: potentially improved oxygen carriers for use in blood substitutes. *Biomacromolecules*, 15(5), 1920-1927.
- Hemcinschi-Lungu, A. & Hancianu, M. (2007). Contribuții la studiul chimic al unor populații spontane de *Galium verum* L. *Romanian Biological Sciences*, 5 (1-2), 62-64.
- Henry, D. E., Chiodo, A. E., & Yang, W. (2011). Central nervous system reorganization in a variety of chronic pain states: a review. *PM&R*, 3(12), 1116-1125.

- Hewlings, S., & Kalman, D. (2017). Curcumin: a review of its' effects on human health. *Foods*, 6(10), 92.
- Ho, S.C. & Su, M.S. (2014). Evaluating the anti-neuroinflammatory capacity of raw and steamed garlic as well as five organosulfur compounds. *Molecules*, 19, 17697-17714.
- Holt, M.K, Trapp S. (2016). The physiological role of the brain GLP-1 system in stress. *Cogent Biololgy*, 2(1), 1229086.
- Hossain, M. A., Salehuddin, S. M., Kabir, M. J., Rahman, S. M. M., & Rupasinghe, H. V. (2009). Sinensetin, rutin, 3'-hydroxy-5, 6, 7, 4'-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of the skin of apple fruit. *Food chemistry*, 113(1), 185-190.
- Houghton, D. C., Hartnett, M., Campbell-Boswell, M., Porter, G., & Bennett, W. (1976). A light and electron microscopic analysis of gentamicin nephrotoxicity in rats. *The American Journal of Pathology*, 82(3), 589.
- Hove, E. L.; Hardin, J. O. (1951). Effect of vitamin E and CCL₄ on fat, respiration and choline oxidase of rat livers. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 78(3), 858-861.
- Howell, A. B. (2002). Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(3), 273-278.
- Huang, W., Yao, L., He, X., Wang, L., Li, M., Yang, Y., & Wan, C. (2018). Hypoglycemic activity and constituents analysis of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruit extracts. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 11, 357.
- Iacob, B., Deac, F., Cioloboc, D., Damian, G. & Silaghi-Dumitrescu, R. (2011). Hemoglobin-albumin Crosslinked Copolymers: Reduced Prooxidant Reactivity. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Immobilization Biotechnologies*, 39(5), 293–7.

- Ide, N., & Lau, B. H. (2001). Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor- κ B activation. *The Journal of Nutrition*, 131(3), 1020-1026.
- Imaizumi, F., Asahina, I., Moriyama, T., Ishii, M., & Omura, K. (2004). Cultured mucosal cell sheet with a double layer of keratinocytes and fibroblasts on a collagen membrane. *Tissue Engineering*, 10 (5-6), 657-664.
- Isacchi, B., Bergonzi, M. C., Carnevali, F., Van der Esch, S. A., Vincieri, F. F., & Bilia, A. R. (2007). Analysis and stability of the constituents of St. John's wort oils prepared with different methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45(5), 756-761.
- Itoh, A.; Isoda, K.; Kondoh, M.; Kawase, M.; Watari, A.; Kobayashi, M.; Yagi, K. (2010). Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl₄-induced liver injury. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(6), 983-987.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., ... & Yamamoto, M. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236(2), 313-322.
- Izol, V., Aridoğan, I. A., Tansuğ, Z., Doran, F., Erdoğan, K. E., Kaplan, H. M., ... & Pazarci, P. (2019). *Hypericum perforatum* extract against oxidative stress, apoptosis and oedema in kidney induced by gentamicin. *Internațional Journal of Pharmacology*, 15, 66-73.
- Jafari, R. A., Jalali, M. R., Ghorbanpoor, M., & Saraei, S. M. (2008). Effect of dietary garlic on immune response of broiler chicks to live Newcastle disease vaccine. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(14), 1848.
- Jahr, J. S., Moallempour, M., & Lim, J. C. (2008). HBOC-201, hemoglobin glutamer-250 (bovine), Hemopure®(Biopure Corporation). *Expert opinion on biological therapy*, 8(9), 1425-1433.

- Jameel, M. K., Joshi, A. R., Dawane, J., Padwal, M., Joshi, A. R., Pandit, V. A., & Melinkeri, R. R. (2014). Effect of various physical stress models on serum cortisol level in wistar rats. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(3), 181-183.
- Jan, A. K., Anis, I., & Shah, M. R. (2015). Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Galium tricornutum* subsp. *longipedunculatum* from Pakistan. *Chemistry of Natural Compounds*, 51(1), 164-165.
- Janbaz, K. H.; Saeed, S. A.; Gilani, A. H.: Protective effect of rutin on paracetamol-and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia*, 73(7-8), 557-563, 2002.
- Jansen, S., Dessein, S., Piesschaert, F., Robbrecht, E., & Smets, E. (2000). Aluminium accumulation in leaves of Rubiaceae: systematic and phylogenetic implications. *Annals of Botany*, 85(1), 91-101.
- Jayanthi, M. K., Dhar, M., & Jayanthi, M. K. (2011). Anti-inflammatory effects of *Allium sativum* (Garlic) in experimental rats. *Biomedicine*, 31(1). 31, 84–89.
- Jayaprakasam, B., Olson, L. K., Schutzki, R. E., Tai, M. H., & Nair, M. G. (2006). Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry (*Cornus mas*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 243-248.
- Jiang, W. L., Fu, F. H., Zheng, S. G., Zhang, D. L., & Zhu, H. B. (2010). 8-O-acetyl shanzhiside methylester attenuates apoptosis and ameliorates mitochondrial energy metabolism in rat cortical neurons exposed to oxygen–glucose deprivation. *European Journal of Pharmacology*, 629(1-3), 20-24.
- Jiang, W. L., Zhang, S. P., Zhu, H. B., & Hou, J. (2011). Effect of 8-O-acetyl Shanzhiside Methylester Increases Angiogenesis and Improves

- Functional Recovery after Stroke. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 108(1), 21-27.
- Jin, S., Kurtz, D. M., Liu, Z. J., Rose, J., & Wang, B. C. (2002). X-ray crystal structures of reduced rubrerythrin and its azide adduct: a structure-based mechanism for a non-heme diiron peroxidase. *Journal of the American Chemical Society*, 124(33), 9845-9855.
- Johnson, S.A., Wang, J.F., Sun, X., McEwen, B.S., Chattarji, S. & Young, L.T. (2009). Lithium treatment prevents stress-induced dendritic remodeling in the rodent amygdale. *Neuroscience*, 163, 34–39.
- Jordö, E. D., Wermeling, F., Chen, Y., & Karlsson, M. C. (2011). Scavenger receptors as regulators of natural antibody responses and B cell activation in autoimmunity. *Molecular Immunology*, 48(11), 1307-1318.
- Jurenka, J. S. (2009). Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Alternative Medicine Review*, 14(2), 141-153.
- Jurica, K., Karačonji, I. B., Šegan, S., Opsenica, D. M., & Kremer, D. (2015). Quantitative analysis of arbutin and hydroquinone in strawberry tree (*Arbutus unedo* L., Ericaceae) leaves by gas chromatography-mass spectrometry/ Kvantitativna analiza arbutina i hidrokinona u listovima obične planike (*Arbutus unedo* L., Ericaceae) plinskokromatografskom metodom uz detekciju masenim spektrometrom. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 66(3), 197-202.
- Kader, S. A. (2017). Effect of *Salvia aegyptiaca* Aqueous Extract on Some Neurohormonal Disorders Induced by Carbon Tetrachloride in Adult Male Albino Rats. *Arab Journal of Nuclear Sciences and Applications*, 50(3), 205-216.
- Kajiwarra, R., Sand, O., Kidokoro, Y., Barish, M. E., & Iijima, T. (1997). Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla. *The Japanese Journal of Physiology*, 47(5), 449-464.

- Kaminska, K., & Rogoz, Z. (2016). The antidepressant-and anxiolytic-like effects following co-treatment with escitalopram and risperidone in rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 67(3), 471-480.
- Kannan, M., Singh, A. R., Kumar, T. A., Jegatheswari, P., & Subburayalu, S. (2007). Studies on immuno-bioactivities of *Nyctanthes arbortristis* (Oleaceae). *African Journal of Microbiology Research*, 1(6), 88-91.
- Katz, L. M., Manning, J. E., McCurdy, S., Pearce, L. B., Gawryl, M. S., Wang, Y., ... & Carolina Resuscitation Research Group. (2002). HBOC-201 improves survival in a swine model of hemorrhagic shock and liver injury. *Resuscitation*, 54(1), 77-87.
- Kesner, R. P., Hunsaker, M. R., & Warthen, M. W. (2008). The CA3 subregion of the hippocampus is critical for episodic memory processing by means of relational encoding in rats. *Behavioral Neuroscience*, 122(6), 1217.
- Kianbakht, S., Abasi, B., & Hashem Dabaghian, F. (2014). Improved lipid profile in hyperlipidemic patients taking *Vaccinium arctostaphylos* fruit hydroalcoholic extract: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Phytotherapy Research*, 28(3), 432-436.
- Kiasalari, Z., Baluchnejadmojarad, T., & Roghani, M. (2016). *Hypericum perforatum* hydroalcoholic extract mitigates motor dysfunction and is neuroprotective in intrastriatal 6-Hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(4), 521-530.
- Kim, K. M., Chun, S. B., Koo, M. S., Choi, W. J., Kim, T. W., Kwon, Y. G., ... & Kim, Y. M. (2001). Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(7), 747-756.
- Kim, Y. S., Kim, J. S., Cho, H. S., Rha, D. S., Kim, J. M., Park, J. D., ... & Kwon, I. H. (2008). Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhalation Toxicology*, 20(6), 575-583.

- Kivalo, E., & Rinne, U. K. (1960). The relation between the hypothalamic neurosecretion and the corticotrophin release in experimental conditions. *European Journal of Endocrinology*, 34(1), 8-18.
- Klusa, V., Germane, S., Nöldner, M., & Chatterjee, S. S. (2001). *Hypericum* extract and hyperforin: memory-enhancing properties in rodents. *Pharmacopsychiatry*, 34(Sup. 1), 61-69.
- Kobayashi, A., Kang, M. I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., ... & Yamamoto, M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and Cellular Biology*, 24(16), 7130-7139.
- Kondo, S., Tsuda, K., Muto, N., & Ueda, J. E. (2002). Antioxidative activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development on selected apple cultivars. *Scientia Horticulturae*, 96(1-4), 177-185.
- Koshova, O.Y. (2015). The effect of the antidiabetic composition on the functional condition of the rat liver in the experimental diabetes. *Вісник фармації*, 1, 69-71.
- Kramer, K., Rademaker, B., Rozendal, W. H. M., Timmerman, H., & Bast, A. (1986). Influence of lipid peroxidation on β -adrenoceptors. *FEBS Letters*, 198(1), 80-84.
- Krolow, R., Arcego, D. M., Noschang, C., Weis, S. N., & Dalmaz, C. (2014). Oxidative imbalance and anxiety disorders. *Current Neuropharmacology*, 12(2), 193-204.
- Kryvtsova, M., Trush, K., Eftimova, J., Kosova, J., & Spivak, M. (2019). Antimicrobial, antioxidant and some biochemical properties of *Vaccinium vitis-idaea* L.
- Kuck, J. L., Dikalov, S. I., Fessel, J. P., Shaver, C. M., Bastarache, J. A., & Ware, L. (2016). Cell-free hemoglobin causes oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and increased endothelial permeability in human pulmonary microvascular endothelial cells. In C28. *The ties*

- that bind: Basic studies in ali and barrier function* (pp. 4777-4777). American Thoracic Society.
- Kumar, R., Kumar, S., Ali, M., Kumar, A., Lawewence, K. & Singh J.K. (2012). Impact of stress on histology and biochemical parameters of liver and kidney of mice. *Innovative Journal of Medical and Health Science*, 2, 63 – 66.
- Kumar, S. (2015). Dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes by allicin. *Indian journal of pharmacology*, 47(4), 444.
- Kunchandy, E., & Rao, M. N. A. (1990). Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *International Journal of Pharmaceutics*, 58(3), 237-240.
- Kunnumakkara, A. B., Bordoloi, D., Padmavathi, G., Monisha, J., Roy, N. K., Prasad, S., & Aggarwal, B.B. (2017). Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1325-1348.
- Kvetnansky, R., McCarty, R., Thoa, N. B., Lake, C. R., & Kopin, I. J. (1979). Sympatho-adrenal responses of spontaneously hypertensive rats to immobilization stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 236(3), 457-462.
- Kwak, H. B. (2013). Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *Journal of Exercise Rehabilitation*, 9(2), 212.
- Kwak, M. K., Itoh, K., Yamamoto, M., Sutter, T. R., & Kensler, T. W. (2001). Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 and antioxidative enzymes in vivo by the cancer chemoprotective agent, 3H-1, 2-dithiole-3-thione. *Molecular Medicine*, 7(2), 135-145.
- Labrecque, J., Bodet, C., Chandad, F., & Grenier, D. (2006). Effects of a high-molecular-weight cranberry fraction on growth, biofilm formation and adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(2), 439-443.
- Lachey, J.L, D'Alessio, D.A., Rinaman, L., Elmquist, J.K., Drucker D.J. & Seeley, R.J. (2005). The role of central glucagon-like peptide-1 in

- mediating the effects of visceral illness: differential effects in rats and mice. *Endocrinology*, 146(1), 458-462.
- Larsen, P.J., Tang-Christensen, M. & Jessop, D.S. (1997). Central administration of glucagon-like peptide-1 activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology*, 138(10), 4445-4455.
- Latimer, K. S. (Ed.). (2011). *Duncan and Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology*. John Wiley & Sons.p. 64-70, 177-81.
- Ledüç, C., Birgel, I., Müller, R., & Leistner, E. (1997). Isochorismate hydroxymutase from a cell-suspension culture of *Galium mollugo* L. *Planta*, 202(2), 206-210.
- Lee, C. C., Chen, Y. T., Chiu, C. C., Liao, W. T., Liu, Y. C., & Wang, H. M. D. (2015). Polygonum cuspidatum extracts as bioactive antioxiadaion, anti-tyrosinase, immune stimulation and anticancer agents. *Journal of bioscience and bioengineering*, 119(4), 464-469.
- Leonard, B. E. (1990). Stress and the immune system: immunological aspects of depressive illness. *International Review of Psychiatry*, 2(3-4), 321-330.
- Leskovac, A., Joksic, G., Jankovic, T., Savikin, K., & Menkovic, N. (2007). Radioprotective properties of the phytochemically characterized extracts of *Crataegus monogyna*, *Cornus mas* and *Gentianella austriaca* on human lymphocytes in vitro. *Planta medica*, 73(11), 1169-1175.
- Li, R., Wang, P., Guo, Q. Q., & Wang, Z. Y. (2011). Anthocyanin composition and content of the *Vaccinium uliginosum* berry. *Food Chemistry*, 125(1), 116-120.
- Li, X. H., Li, C. Y., Lu, J. M., Tian, R. B., & Wei, J. (2012). Allicin ameliorates cognitive deficits ageing-induced learning and memory deficits through enhancing of Nrf2 antioxidant signaling pathways. *Neuroscience Letters*, 514(1), 46-50.
- Li, X. X., Du, L. D., & Du, G. H. (2018). Arbutin. In: *Natural Small Molecule Drugs from Plants* (pp. 667-670). Springer, Singapore.

- Liu, K. L., Chen, H. W., Wang, R. Y., Lei, Y. P., Sheen, L. Y., & Lii, C. K. (2006). DATS reduces LPS-induced iNOS expression, NO production, oxidative stress, and NF- κ B activation in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3472-3478.
- Liu, S. G., Ren, P. Y., Wang, G. Y., Yao, S. X., & He, X. J. (2015). Allicin protects spinal cord neurons from glutamate-induced oxidative stress through regulating the heat shock protein 70/inducible nitric oxide synthase pathway. *Food & Function*, 6(1), 320-329.
- Liu, Y., Black, M. A., Caron, L., & Camesano, T. A. (2006). Role of cranberry juice on molecular-scale surface characteristics and adhesion behavior of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(2), 297-305.
- Liu, Z. J., Li, Z. H., Liu, L., Tang, W. X., Wang, Y., Dong, M. R., & Xiao, C. (2016). Curcumin attenuates beta-amyloid-induced neuroinflammation via activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma function in a rat model of Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 261.
- Lodish H., Berk A., Zipursky L.S., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (1999). *Molecular cell biology*. New York: Scientific American Books, 230-256.
- Lopes, C. M. C., Lazzarini, J. R., Soares Júnior, J. M., & Baracat, E. C. (2018). Phytotherapy: yesterday, today, and forever?. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 64(9), 765-768.
- Lund, T., Stokke, T., Olsen, Ø. E., & Fodstad, Ø. (2005). Garlic arrests MDA-MB-435 cancer cells in mitosis, phosphorylates the proapoptotic BH3-only protein Bim EL and induces apoptosis. *British Journal of Cancer*, 92(9), 1773-1781.
- Madrigal, J.L., Olivenza, R., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Rodrigo, J. & Leza, J.C. (2001). Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology*, 24, 420-29.

- Magarin, A. M., & McEwen, B. S. (1995). Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience*, 69(1), 83-88.
- Magariños, A. M., McEwen, B. S., Flügge, G., & Fuchs, E. (1996). Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *Journal of Neuroscience*, 16(10), 3534-3540.
- Magariños, A.M., Orchinik, M. & McEwen, B.S. (1998). Morphological changes in the hippocampal CA3 region induced by non-invasive glucocorticoid administration: a paradox. *Brain Research*, 809, 314-318.
- Maheshwari, R. K., Singh, A. K., Gaddipati, J., & Srimal, R. C. (2006). Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sciences*, 78(18), 2081-2087.
- Maisenbacher, P. & Kovar, K.A. (1992). Analysis and stability of *Hyperici oleum*. *Planta Medica*, 58, 351-354.
- Maldonado, P.D., Barrera, D. & Rivero I. (2003). Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(3), 317-324.
- Maldonado-Bouchard, S., Peters, K., Woller, S. A., Madahian, B., Faghihi, U., Patel, S., ... & Hook, M. A. (2016). Inflammation is increased with anxiety-and depression-like signs in a rat model of spinal cord injury. *Brain, Behavior, and Immunity*, 51, 176-195.
- Marrelli, M., Statti, G., Conforti, F., & Menichini, F. (2016). New potential pharmaceutical applications of hypericum species. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 16(9), 710-720.
- Martineau, C., Kevorkova, O., Brissette, L., & Moreau, R. (2014). Scavenger receptor class B, type I (Scarb1) deficiency promotes osteoblastogenesis but stunts terminal osteocyte differentiation. *Physiological reports*, 2(10), e12117.

- Masood, A, Nadeem, A.S., Mustafa J.M., O'Donnell J. Reversal of oxidative stress-induced anxiety by inhibition of phosphodiesterase-2 in mice. (2008). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapies*, 326, 369-379.
- Masuda, Y. (2006). Learning toxicology from carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Yakugakuzasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 126(10), 885-899.
- Matkowski A. & Piotrowska I. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, 77(5), 346-353.
- McDonald, C. R., Bauer, R. M., Grande, L., Gilmore, R., & Roper, S. (2001). The role of the frontal lobes in memory: Evidence from unilateral frontal resections for relief of intractable epilepsy. *Archives of Clinical Neuropsychology*, 16(6), 571-585.
- Mcmillan, F. D. (2012). What dictionary are animal researchers using?. *Journal of Animal Ethics*, 2(1), 1-5.
- Medina-Campos, O.N., Barrera, D. & Segoviano-Murillo, S. (2007). S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK1 cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 45(10), 2030–2039.
- Meffert, M. K., Chang, J. M., Wiltgen, B. J., Fanselow, M. S., & Baltimore, D. (2003). NF- κ B functions in synaptic signaling and behavior. *Nature Neuroscience*, 6(10), 1072-1078.
- Menon, V. P., & Sudheer, A. R. (2007). Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. In *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease* (pp. 105-125). Springer, Boston, MA.
- Mihailović, N. R.; Mihailović, V. B.; Kreft, S.; Ćirić, A. R.; Joksović, L. G.; Đurđević, P. T. (2018). Analysis of phenolics in the peel and pulp of wild apples (*Malus sylvestris* (L.) Mill.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 67, 1-9.

- Milenković-Anđelković, A. S., Anđelković, M. Z., Radovanović, A. N., Radovanović, B. C., & Nikolić, V. (2015). Phenol composition, DPPH radical scavenging and antimicrobial activity of Cornelian cherry (*Cornus mas*) fruit and leaf extracts. *Hemijska Industrija*, 69(4), 331-337.
- Milića, P.S., Rajkovića, K.M., Stamenković, O.S. & Veljković, V.B. (2013). Kinetic modeling and optimization of maceration and ultrasound-extraction of resinoid from the aerial parts of white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 525-534.
- Mill, R.R., *Lamium* L. In: Davis, P.H. (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol. 7. Edinburgh University Press, Edinburgh, UK, pp. 126-148, 1982.
- Mitic, V. D., Stankov-Jovanovic, V. P., Ilic, M. D., Vasiljevic, P. J., Zabar, A. L., & Stojanovic, G. S. (2014). The antioxidant, hemolytic and cholinesterase inhibition properties of *Galium verum* L. and *Tragopogon pratensis* subsp. *pratensis*. *Bulgarian Chemical Communications*, 46(2), 269-276.
- Mohan, L., Rao, U. S. C., Gopalakrishna, H. N., & Nair, V. (2011). Evaluation of the anxiolytic activity of NR-ANX-C (a polyherbal formulation) in ethanol withdrawal-induced anxiety behavior in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-7.
- Moldovan, B., Filip, A., Clichici, S., Suharoschi, R., Bolfa, P., & David, L. (2016). Antioxidant activity of Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruits extract and the in vivo evaluation of its anti-inflammatory effects. *Journal of Functional Foods*, 26, 77-87.
- Monjan, A.A. & Collector, M.I. (1977). Stress-induced modulation of immune response. *Science*, 196, 307-308.
- Moroz, G. A., Kriventsov, M. A., & Kutia, S. A. (2018). Morphofunctional changes in the adrenal glands of juvenile rats systematically exposed to hypergravity. *Russian Open Medical Journal*, 7(4), 1-8.
- Moskova-Doumanova, V., Miteva, G., Dimitrova, M., Topouzova-Hristova, T. & Kapchina, V. (2012). Methanol and chloroform

- extracts from *Lamium album* L. affect cell properties of A549 cancer lung cell line. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 26(1), 120-125.
- Mot, A. C., Roman, A., Lupan, I., Kurtz, D. M., & Silaghi-Dumitrescu, R. (2010). Towards the development of hemerythrin-based blood substitutes. *The Protein Journal*, 29(6), 387-393.
- Moț, A.C., Bischin, C., Muresan, B., Parvu, M., Damian, G., Vlase, L. & Silaghi-Dumitrescu, R. (2015). Antioxidant activity evaluation by physiologically relevant assays based on haemoglobin peroxidase activity and cytochrome *c*-induced oxidation of liposomes, *Natural Product Research*, 30(11), 1315-1319.
- Müller, W. E., Singer, A., Wonnemann, M., Hafner, U., Rolli, M., & Schäfer, C. (1998). Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of *Hypericum* extract. *Pharmacopsychiatry*, 31(S1), 16-21.
- Münster-Wandowski, A., Gómez-Lira, G. & Gutiérrez, R. (2013). Mixed neuro-transmission in the hippocampal mossy fibers. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(210), 1-19.
- Mustafa, B., Hajdari, A., Pajazita, Q., Sylva, B., Quave, C. L., & Pieroni, A. (2012). An ethnobotanical survey of the Gollak region, Kosovo. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(5), 739-754.
- Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., Suresta, A., Caprioli, G., Iannarelli, R., Sokeng, A. J. T., ... & Daglia, M. (2018). The water extract of tutsan (*Hypericum androsaemum* L.) red berries exerts antidepressive-like effects and *in vivo* antioxidant activity in a mouse model of post-stroke depression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 99, 290-298.
- Nafie, E. H., Khater, E., Awwad, M., Zowail, M., & Hegazy, K. (2017). The ameliorative role of cranberry extract and bone marrow cells against chlorambucil cytotoxicity in rat fertility. *African Journal of Biotechnology*, 16(6), 274-279.

- Ng, Q. X., Venkatanarayanan, N., & Ho, C. Y. X. (2017). Clinical use of *Hypericum perforatum* (St John's wort) in depression: a meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, 210, 211-221.
- Noorafshan, A., & Ashkani-Esfahani, S. (2013). A review of therapeutic effects of curcumin. *Current Pharmaceutical Design*, 19(11), 2032-2046.
- Numagami Y. & Ohnishi S. T. (2001). S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *Journal of Nutrition*, 131(3), 1100S-1105.
- Ohl, F., Michaelis, T., Vollmann-Honsdorf, G.K., Kirschbaum, C. & Fuchs, E., (2000). Effect of chronic psychosocial stress and long-term cortisol treatment on hippocampus-mediated memory and hippocampal volume: a pilot study in tree shrews. *Psychoneuroendocrinology*, 25(4), 357-363.
- Olivera, A., Moore, T. W., Hu, F., Brown, A. P., Sun, A., Liotta, D. C., ... & Miller, A. H. (2012). Inhibition of the NF-κB signaling pathway by the curcumin analog, 3, 5-Bis (2-pyridinylmethylidene)-4-piperidone (EF31): anti-inflammatory and anti-cancer properties. *International Immunopharmacology*, 12(2), 368-377.
- Opris, R., Toma, V., Olteanu, D., Baldea, I., Baci, A. M., Lucaci, F. I., ... & David, L. (2019). Effects of silver nanoparticles functionalized with *Cornus mas* L. extract on architecture and apoptosis in rat testicle. *Nanomedicine*, 14(3), 275-299.
- Orhan, N., Orhan, D. D., Aslan, M., Şüküroğlu, M., & Orhan, I. E. (2012). UPLC-TOF-MS analysis of *Galium spurium* towards its neuroprotective and anticonvulsant activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(1), 220-227.
- Oszmiański, J., Wojdyło, A., Lachowicz, S., Gorzelany, J., & Matłok, N. (2016). Comparison of bioactive potential of cranberry fruit and fruit-based products versus leaves. *Journal of Functional Foods*, 22, 232-242.
- Ozaydin, S., Dirmenci, T., Tumen, G. & Baser, K.H.C. (2006). Plants used as analgesic in the folk medicine Turkey. In: Ertug, F. (Ed.),

- Proceedings of the 4th International Congress of Ethnobotany* (ICEB 2005). Ege Publications, pp. 167–171.
- Paduch, R., Matysik, G., Wójciak-Kosior, M., Kandefer-Szerszeń, M., Skalska-Kamińska, A., Nowak-Kryśka, M. & Niedziela, P. (2008). *Lamium album* extracts express free radical scavenging and cytotoxic activities. *Polish Journal of Environmental Studies*, 17(4), 569-580.
- Pandit, A.; Sachdeva, T.; Bafna, P. (2012). Drug-Induced Hepatotoxicity: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(05), 233-243.
- Parada, E., Buendia, I., Navarro, E., Avendaño, C., Egea, J., & López, M. G. (2015). Microglial HO-1 induction by curcumin provides antioxidant, antineuroinflammatory, and glioprotective effects. *Molecular nutrition & food research*, 59(9), 1690-1700.
- Park, J.B. (2009). Isolation and characterization of N-feruloyltyramine as the P-selectin expression suppressor from garlic (*Allium ursinum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 14, 8868–8872.
- Pascu, M., Pascu, D. E., Cozea, A., Bunaciu, A. A., Miron, A. R., & Nechifor, C. A. (2015). Biologically active extracts with kidney affections applications. *Applied Surface Science*, 358, 647-654.
- Pawlowska, A. M., Camangi, F., & Braca, A. (2010). Quali-quantitative analysis of flavonoids of *Cornus mas* L.(Cornaceae) fruits. *Food Chemistry*, 119(3), 1257-1261.
- Peixoto, T. C., Moura, E. G., de Oliveira, E., Soares, P. N., Guarda, D. S., Bernardino, D. N., ... & Figueiredo, M. S. (2018). Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) extract treatment improves triglyceridemia, liver cholesterol, liver steatosis, oxidative damage and corticosteronemia in rats rendered obese by high fat diet. *European Journal of Nutrition*, 57(5), 1829-1844.
- Pereira, O.R., Domingues, M.R.M., Silva, A.M.S. & Cardoso, S.M. (2013a). Phenolic constituents of *Lamium album*: Focus on isoscutellarein derivatives. *Food Research International*, 48, 330–335.

- Pereira, O.R., Macias, R.I.R., Perez, M.J., Marin, J.J.G. & Cardoso, S.M. (2013b). Protective effects of phenolic constituents from *Cytisus multiflorus*, *Lamium album* L. and *Thymus citriodorus* on liver cells. *Journal of Functional Foods*, 5, 1170-1179.
- Petukhova, N. M., Buryakina, A. V., Avenirova, E. L., Burakova, M. A., & Drozhzhina, E. V. (2008). Studies of the biological activity of an oil extract of the snakeflower *Lamium album*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42(6), 354-356.
- Picuric-Jovanovic, K., Milovanovic, M., Budincevic, M., & Vrbaski, Z. (1997). Antioxydative Wirkung von *Lamium purpureum* als Nahrungsmittelzusatzstoff, *Acta of the Symposium "Vitamine und Zusatzstoffe"*, Viena, 24–25 Septembrie.
- Pietraforte, D., Salzano, A. M., Marino, G., & Minetti, M. (2003). Peroxynitrite-dependent modifications of tyrosine residues in hemoglobin. Formation of tyrosyl radical (s) and 3-nitrotyrosine. *Amino Acids*, 25(3-4), 341-350.
- Pilati, N., Barker, M., Panteleimonitis, S., Donga, R., & Hamann, M. (2008). A rapid method combining Golgi and Nissl staining to study neuronal morphology and cytoarchitecture. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56(6), 539-550.
- Pitman, D. L., Ottenweller, J. E., & Natelson, B. H. (1988). Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. *Physiology & Behavior*, 43(1), 47-55.
- Plinius (23-79 A.D.). The natural history. Book XXVI, Chapter LXXX. Cited after: Bostock J, Riley HT, editors. London: Taylor and Francis; 1855. The Perseus Digital Library.
- Plüddemann, A., Neyen, C. & Gordon, S. (2007). Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods*, 43, 207–217.
- Popescu M, Milițiu I, Cireașă V. și colab. (1992). Pomicultura (generală și specială). Ed Didactică și Pedagogică, București, 409-416.

- Prokop, J., Lněničková, K., Cibiček, N., Kosina, P., Tománková, V., Jourová, L., ... & Zapletalová, I. (2019). Effect of bilberry extract (*Vaccinium myrtillus* L.) on drug-metabolizing enzymes in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 129, 382-390.
- Pryor, W.A., Strickland, T. & Church, D.F. (1988). Comparisons of the efficiencies of several natural and synthetic antioxidants in aqueous sodium dodecyl sulfate micelle solutions. *Journal of American Chemistry Society*, 110, 2224-2229.
- Pu, H.J., Cao, Y.F., He, R.R., Zhao, Z.L., Song, J.H., Jiang, B., ... & Kurihara, H. (2012). Correlation between antistress and hepatoprotective effects of schisandra lignans was related with its antioxidative actions in liver cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1-7.
- Rabinkov, A., Miron, T., Mirelman, D., Wilchek, M., Glozman, S., Yavin, E., & Weiner, L. (2000). S-Allylmercaptogluthathione: the reaction product of allicin with glutathione possesses SH-modifying and antioxidant properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1499(1-2), 144-153.
- Rahimi, S., Teymouri, Z. Z., Karimi, T. M., Omidbaigi, R., & Rokni, H. (2011). Effect of the three herbal extracts on growth performance, immune system, blood factors and intestinal selected bacterial population in broiler chickens. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2011, 527-539.
- Ramos-Gomez, M., Kwak, M.K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P. & Kensler, T.W. (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice, *Proceedings of National Academy for Science USA*, 98, 3410-3415.
- Rangasamy, T., Cho, C.Y., Thimmulappa, R.K., Zhen, L., Srisuma, S.S., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Petrache, I., Tuder, R.M. & Biswal S. (2004). Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette

- smoke-induced emphysema in mice, *Journal of Clinical Investigations*, 114, 1248–1259.
- Reagan, L.P., Rosell, D.R., Wood, G.E., Spedding, M., Muñoz, C. & Rothstein, J. (2004). Chronic restraint stress up-regulates GLT-1 mRNA and protein expression in the rat hippocampus: Reversal by tianeptine. *Proceedings of National Academy for Science USA*, 101(7), 2179–2184.
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal*, 22(3), 659–661.
- Reeder, B. J., & Wilson, M. T. (2005). Hemoglobin and myoglobin associated oxidative stress: from molecular mechanisms to disease states. *Current Medicinal Chemistry*, 12(23), 2741–2751.
- Ren, Y. M., Ke, C. Q., Tang, C., Yao, S., & Ye, Y. (2017). Divaccinosides A–D, four rare iridoid glucosidic truxillate esters from the leaves of *Vaccinium bracteatum*. *Tetrahedron Letters*, 58(24), 2385–2388.
- Ricardo da Silva, J.M., Darmon, N., Fernandez, Y. & Mitjavila, S. (1991). Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1549–1552.
- Rifkind, J. M., Mohanty, J. G., & Nagababu, E. (2015). The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. *Frontiers in Physiology*, 5, 500.
- Rink, C., & Khanna, S. (2011). Significance of brain tissue oxygenation and the arachidonic acid cascade in stroke. *Antioxidants & redox signaling*, 14(10), 1889–1903.
- Robak, J. & Gryglewski, R.J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.*, 37, 837–841.
- Robinson, J. P., Harris, S. A., & Juniper, B. E. (2001). Taxonomy of the genus *Malus* Mill.(Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. *Plant Systematics and Evolution*, 226(1-2), 35–58.

- Roman, I., & Puică, C. (2013). Effects of anakinetic stress and *Galium verum* extract on the thyroid and ovary morphology in Wistar rats. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 70(1), 167-169.
- Roman, I., Puica, C., & Toma, V. A. (2016). The effect of *Lamium album* and *Lamium purpureum* extracts on some blood parameters under anakinetic stress conditions in Wistar rats. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 73(1), 18-20.
- Roman, I., Toma, V. A., & Farcaș, A. D. (2015). Protective effects of *Galium verum* L. extract on the hypothalamic--pituitary-adrenal axis under anakinetic stress conditions, in rats. Histological aspects. *Studia Universitatis Vasile Goldis Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series)*, 25(3), 207-214.
- Roman, I., Puică, C., Toma, V., Necula, R., & Grigoraș, V. A. (2017). Effects of *Lamium album* and *Lamium purpureum* extracts administration on the liver function in anakinetic stress conditions. *Studii și Cercetări – Biology*, 20, 31-42.
- Rop, O., Jurikova, T., Sochor, J., Mlcek, J., & Kramarova, D. (2011). Antioxidant capacity, scavenging radical activity and selected chemical composition of native apple cultivars from Central Europe. *Journal of Food Quality*, 34(3), 187-194.
- Rostamkhani, F., Zardooz, H., Zahediasl, S. & Farrokhi, B. (2012). Comparison of the effects of acute and chronic psychological stress on metabolic features in rats. *Journal of Zhejiang University Science B*, 13 (11), 904-912.
- Rusmann, S.; Kullak-Ublick, G. A.; Grattagliano, I. (2009). Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. *Current Medicinal Chemistry*, 16(23), 3041-3053.
- Sagor, A. T., Chowdhury, M. R. H., Tabassum, N., Hossain, H., Rahman, M. M., & Alam, M. A. (2015). Supplementation of fresh ucche (*Momordica charantia* L. var. *muricata* Willd) prevented oxidative

- stress, fibrosis and hepatic damage in CCl₄ treated rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 115.
- Şahin E., & Gümüşlü S. (2004). Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. *Behavior Brain Research*, 155, 241-48.
- Şahin E., & Gümüşlü S. (2007). Immobilization stress in rat tissues: Alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 144, 342-47.
- Sajdel-Sulkowska, E.M., Lipinski, B., Windom, H., Audhya, T. & McGinnis, W. (2008). Oxidative stress in autism: elevated cerebellar 3-nitrotyrosine levels. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4 (2), 73-84.
- Saleem, S., Khan, R., Kazmi, I., & Afzal, M. (2019). Medicinal Plants in the Treatment of Arthritis. In *Plant and Human Health, Volume 3* (pp. 101-137). Springer, Cham.
- Salehi, B., Zucca, P., Orhan, I. E., Azzini, E., Adetunji, C. O., Mohammed, S. A., ... & Armstrong, L. (2019). Allicin and health: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 502–512
- Sankpal, U. T., Nagaraju, G. P., Gottipolu, S. R., Hurtado, M., Jordan, C. G., Simecka, J. W., ... & Basha, R. (2016). Combination of tolafenamic acid and curcumin induces colon cancer cell growth inhibition through modulating specific transcription factors and reactive oxygen species. *Oncotarget*, 7(3), 3186.
- Sanoner, P., Bochard, V., Charissou, L., Lastique, B., Jacob, M., & Thomas, P. (2019). *U.S. Patent Application No. 16/144,246*.
- Santana, D. G., Oliveira, A. S., Souza, M. T. D. S., Santos, J. T. D. C., Hassimotto, N. M. A., Grespan, R., & Camargo, E. A. (2018). *Vaccinium macrocarpon* aiton extract ameliorates inflammation and hyperalgesia through oxidative stress inhibition in experimental

acute pancreatitis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1-13.

Sarac, N. & Ugur, A., (2007). Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. *EurAsia Journal of BioSciences*, 4, 28-37.

Savchenko, T., Blackford, M., Sarker, S.D. & Dinan, L. (2001). Phytoecdysteroids from *Lamium* spp: identification and distribution within plants, *Biochemistry Systematics and Ecology*, 29(9), 891-900.

Šavikin, K., Zdunić, G., Janković, T., Stanojković, T., Juranić, Z., & Menković, N. (2009). In vitro cytotoxic and antioxidative activity of *Cornus mas* and *Cotinus coggygia*. *Natural Product Research*, 23(18), 1731-1739.

Schäfer, G., & H Kaschula, C. (2014). The immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic organosulfur compounds in cancer chemoprevention. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 14(2), 233-240.

Schäfer, G., Guler, R., Murray, G., Brombacher, F., & Brown, G. D. (2009). The role of scavenger receptor B1 in infection with *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *PloS One*, 4(12).

Schempp, C.M., Lüdtke, R., Winghofer, B. & Simon JC. (2000). Effect of topical application of *Hypericum perforatum* extract (St. John's wort) on skin sensitivity to solar simulated radiation. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*, 16, 125-128.

Schmidt, M., Polednik, C., Roller, J., & Hagen, R. (2014a). *Galium verum* aqueous extract strongly inhibits the motility of head and neck cancer cell lines and protects mucosal keratinocytes against toxic DNA damage. *Oncology Reports*, 32(3), 1296-1302.

Schmidt, M., Scholz, C. J., Gavril, G. L., Otto, C., Polednik, C., Roller, J., & Hagen, R. (2014b). Effect of *Galium verum* aqueous extract on growth, motility and gene expression in drug-sensitive and-resistant

- laryngeal carcinoma cell lines. *International Journal of Oncology*, 44(3), 745-760.
- Schrepler, M. P., Moldovan, D. C., Berindan-Neagoe, I. Krausz, L. T., Mikláš, R., Fischer-Fodor, E., ... & Virag, P. (2015). Immunomodulatory potential of palladium (ii) complexes with (1e, 6e)-1, 7-bis (3, 4-dimethoxyphenyl) hepta-1, 6-diene-3, 5-dione. *Studia Universitatis Babes-Bolyai, Chemia*, 60(2), 93-100.
- Schulz, V., Hänsel, R., & Tyler, V. E. (2001). Rational phytotherapy: a physician's guide to herbal medicine. *Psychology Press*, 1-10.
- Scurtu, F., Zolog, O., Iacob, B., & Silaghi-Dumitrescu, R. (2014). Hemoglobin–albumin cross-linking with disuccinimidyl suberate (DSS) and/or glutaraldehyde for blood substitutes. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 42(1), 13-17.
- Scurtu, V. F., Moț, A., & Silaghi-Dumitrescu, R. (2013). Protein-based blood substitutes: recent attempts at controlling pro-oxidant reactivity with and beyond hemoglobin. *Pharmaceuticals*, 6(7), 867-880.
- Selim, A. M. (2019). Alleviation of age related biochemical and molecular changes in rat liver by supplementation of certain natural products. *CU Theses*, 1-15.
- Sendl A., Elbl G., Steinke B., Redl K., Breu W. & Wagner H. (1992). Comparative pharmacological investigations of *Allium ursinum* and *Allium sativum*. *Planta Medica*, 58, 1–7.
- Sevastre-Berghian, A. C., Toma, V. A., Sevastre, B., Hanganu, D., Vlase, L., Benedec, D., ... & Decea, N. (2018). Characterization and biological effects of *Hypericum* extracts on experimentally-induced-anxiety, oxidative stress and inflammation in rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 6(9), 789-800.
- Sharma, V., & McNeill, J. H. (2009). To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. *British journal of Pharmacology*, 157(6), 907-921.
- Simoni, J., Villanueva-Meyer, J., Simoni, G., Moeller, J. F., & Wesson, D. E. (2009). Control of oxidative reactions of hemoglobin in the design of

- blood substitutes: role of the ascorbate–glutathione antioxidant system. *Artificial organs*, 33(2), 115-126.
- Sipes, I. G.; El Sisi, A. E.; Sim, W. W.; Mobley, S. A.; Earnest, D. L. (1991). Reactive oxygen species in the progression of CCl₄-induced liver injury. In *Biological Reactive Intermediates IV* (pp. 489-497), Springer, Boston, MA.
- Sivaci, A. (2006). Seasonal changes of total carbohydrate contents in three varieties of apple (*Malus sylvestris* Miller) stem cuttings. *Scientia Horticulturae*, 109(3), 234-237.
- Soltani, R., Gorji, A., Asgary, S., Sarrafzadegan, N., & Siavash, M. (2015). Evaluation of the effects of Cornus mas L. fruit extract on glycemic control and insulin level in type 2 diabetic adult patients: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1-5.
- Spencer, J.P.E., Abd, El Mohsen, M.M. & Rice-Evans, C. (2004). Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 423, 148–161.
- Spiers, J. G., Chen, H. J., Bradley, A. J., Anderson, S. T., Sernia, C., & Lavidis, N. A. (2013). Acute restraint stress induces rapid and prolonged changes in erythrocyte and hippocampal redox status. *Psychoneuroendocrinology*, 38(11), 2511-2519.
- Standl, T., Freitag, M., Burmeister, M. A., Horn, E. P., Wilhelm, S., & am Esch, J. S. (2003). Hemoglobin-based oxygen carrier HBOC-201 provides higher and faster increase in oxygen tension in skeletal muscle of anemic dogs than do stored red blood cells. *Journal of Vascular Surgery*, 37(4), 859-865.
- Stojiljković, D., Arsić, I., & Tadić, V. (2016). Extracts of wild apple fruit (*Malus sylvestris* (L.) Mill. *Rosaceae*) as a source of antioxidant substances for use in production of nutraceuticals and cosmeceuticals. *Industrial Crops and Products*, 80, 165-176.

- Stratu A., Cărbunaru D.C., Murariu A., Costică N., Ecophysiological characteristics in species with medicinal value from Rediu forest (Botoșani county). *Analele științifice ale Universității „Al. I. Cuza” Iași*, LVII (2), s. II a. Biologie vegetală, 2011.
- Strobel J., Hieke M., Gebauer E., Windi E. & Gröger D. (1990). The influence of organic and inorganic chemical factors on cell growth and anthraquinone formation in suspension cultures of *Galium verum*. *Journal of Plant Physiology*, 186,117-124.
- Sugama, S., Fujita, M., Hashimoto, M., Conti, B., 2007. Stress induced morphological microglial activation in the rodent brain: involvement of interleukin-18. *Neuroscience*, 146, 1388–1399.
- Sugama, S., Sekiyama, K., Kodama, T., Takamatsu, Y., Takenouchi, T., Hashimoto, M., ... & Kakinuma, Y. (2016). Chronic restraint stress triggers dopaminergic and noradrenergic neurodegeneration: possible role of chronic stress in the onset of Parkinson's disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, 51, 39-46.
- Sun, H.; Che, Q. M.; Zhao, X.; Pu, X. P. (2010). Antifibrotic effects of chronic baicalein administration in a CCl₄ liver fibrosis model in rats. *European Journal of Pharmacology*, 631(1-3), 53-60.
- Sunanda, B.S., Shankaranarayana, R. & Raju, T.R. (2000). Restraint stress-induced alterations in the levels of niogenic amines, amino acids, and AChE activity in the hippocampus. *Neurochemical Research*, 25(12), 1547-1552.
- Suzuki, Y.J., Tsuchiya, M., Packer, L. (1991). Thiocctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. *Free Radical Research and Communications*, 15, 255-263.
- Svistunenko, D. A. (2005). Reaction of haem containing proteins and enzymes with hydroperoxides: the radical view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1707(1), 127-155.

- Świerczewska, A., Buchholz, T., Melzig, M. F., & Czerwińska, M. E. (2019). In vitro α -amylase and pancreatic lipase inhibitory activity of *Cornus mas* L. and *Cornus alba* L. fruit extracts. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(1), 249-258.
- Szegedi, A., Kohnen, R., Dienel, A., & Kieser, M. (2005). Acute treatment of moderate to severe depression with *Hypericum* extract WS 5570 (St John's wort): randomised controlled double blind non-inferiority trial versus paroxetine. *BMJ*, 330(7490), 503.
- Tagarelli, G., Tagarelli, A., Liguori, M., & Piro, A. (2013). Treating epilepsy in Italy between XIX and XX century. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(2), 608-613.
- Tajima, K., Sakamoto, M., Okada, K., Mukai, K., Ishizu, K., Sakurai, H., & Mori, H. (1983). Reaction of biological phenolic antioxidants with superoxide generated by cytochrome P-450 model system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 115(3), 1002-1008.
- Tămaș M. & Stana D. (2006). Comparative phytochemical research of *Galium verum* L. and *Galium mollugo* L. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj*, 34, 18-20.
- Tămaș M., (1971). Cercetări chemotaxonomice la Ericalele din RSR. *Revista Medicală* (Tg. Mureș) 17 (2), 202-207.
- Tămaș M., (2005). Botanică farmaceutică. Ed. Medicală Universitară, „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, 1-10.
- Tămaș, M., Vlase, L., Toiu, A., Morar, R., Coste, A. & Oniga I. (2012). Specifications on the chemical composition and therapeutical properties of *Vaccinium vitis-idaea* L. Fruits. *Contribuții Botanice*, XLVII, 85-89.
- Terris, M.K., Issa, M.M. & Tacker, J.R. (2001). Dietary supplementation with cranberry concentrate tablets may increase the risk of nephrolithiasis. *Urology*, 57, 26–29.
- Thakur, M., Gupta, H., Singh, D., Mohanty, I. R., Maheswari, U., Vanage, G., & Joshi, D. S. (2014). Histopathological and ultra structural effects

- of nanoparticles on rat testis following 90 days (Chronic study) of repeated oral administration. *Journal of Nanobiotechnology*, 12(1), 42, 1-13.
- Thiele, B., Brink, I., & Ploch, M. (1994). Modulation of cytokine expression by hypericum extract. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 7(1), 60-62.
- Toda, S., Miyase, T., Arichi, H., Tanizawa, H., & Takino, Y. (1985). Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 33(4), 1725-1728.
- Todorov, D., Dimitrova, M., Shishkova, K., Yordanova, Zh., Kapchina-Toteva, V. & Shishkov, S. (2013). Comparative anti-herpes effects of the chloroform in vitro and in vivo extracts, derived from *Lamium album* L. *Bulgarian Journal of Agricultural Sciences*, 2(19), 190-193,
- Toma, V. A., Farcas, A. D., Parvu, M., Silaghi-Dumitrescu, R., & Roman, I. (2017). CA3 hippocampal field: cellular changes and its relation with blood nitro-oxidative stress reveal a balancing function of CA3 area in rats exposed to repeated restraint stress. *Brain Research Bulletin*, 130, 10-17.
- Toma, V. A., Farcas, A. D., Roman, I., Sevastre, B., Hathazi, D., Scurtu, F., Damian, G., Silaghi-Dumitrescu, R. (2018). In vivo evaluation of hemerythrin-based oxygen carriers: Similarities with hemoglobin-based counterparts. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 1422-1427.
- Toma, V. A., Farcas, A. D., Roman, I., Sevastre, B., Hathazi, D., Scurtu, F., ... & Silaghi-Dumitrescu, R. (2016). Comparative in vivo effects of hemoglobin-based oxygen carriers (HBOC) with varying prooxidant and physiological reactivity. *PLoS One*, 11(4), 1-16.
- Toma, V. A., Tigau, A. B., Farcas, A. D., Sevastre, B., Taulescu, M., Gherman, A. M. R., ... & Pârvu, M. (2019). New Aspects Towards a Molecular Understanding of the Allicin Immunostimulatory Mechanism via

- Colec12, MARCO, and SCARB1 Receptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3627.
- Topouzova-Hristova, T., Moskova-Doumanova, V., Keremidarska, M., Doumanov, J., Miteva, G., Petkova, B. & Kapchina-Toteva, V. (2012). Anticancer effect of plant extracts from *Lamium album* L. by induction of cell death *in vitro*. *Science and Technologies*, II(1), 1-5.
- Trio, P. Z., You, S., He, X., He, J., Sakao, K., & Hou, D. X. (2014). Chemopreventive functions and molecular mechanisms of garlic organosulfur compounds. *Food & function*, 5(5), 833-844.
- Turillazzi, E., Neri, M., Cerretani, D., Cantatore, S., Frati, P., Moltoni, L., ... & Fineschi, V. (2016). Lipid peroxidation and apoptotic response in rat brain areas induced by long-term administration of nandrolone: the mutual crosstalk between ROS and NF- κ B. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(4), 601-612.
- Tzianabos, A.O. (2000). Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 523-533.
- Uei, Y. (1988). Immunohistological study of Crooke's cells. *Pathology-Research and Practice*, 183(5), 636-637.
- Ukkola, O., Erkkilä, P. H., Savolainen, M. J., & Kesäniemi, Y. A. (2001). Lack of association between polymorphisms of catalase, copper-zinc superoxide dismutase (SOD), extracellular SOD and endothelial nitric oxide synthase genes and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Internal Medicine*, 249(5), 451-459.
- Uma, S., Kavimani, S., & Raman, K. V. (2010). Effect of Saraswatarishta on learning and memory. *International Journal of Phytopharmacology*, 1(1), 15-19.
- Unsal, V. (2018). Natural phytotherapeutic antioxidants in the areatment of mercury intoxication-a review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 8(3), 365.

- Urban, S., Zieseniss, S., Werder, M., Hauser, H., Budzinski, R. & Engelmann, B. (2000). Scavenger receptor BI transfers major lipoprotein-associated phospholipids into the cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 33409–33415.
- Uurlink, B.H.J. (1997). *Response of glial cells to ischemia: roles of reactive oxygen species and glutathione. Neuroscience and Biobehavior Reviews*, 21(2), 151–166.
- van Wyk BE, Wink M. Medicinal plants of the World: an Illustrated Scientific Guide to Important Medicinal Plants and their Uses. Portland, Oregon: Timber Press Inc. pp. 187; 362-363; 414, 2004.
- Vandebroek, I., & Moerman, D. E. (2015). The anthropology of ethnopharmacology. *Ethnopharmacology*, 17, 17-28.
- Vogelzangs, N., Beekman, A. T. F., De Jonge, P., & Penninx, B. W. J. H. (2013). Anxiety disorders and inflammation in a large adult cohort. *Translational Psychiatry*, 3, e249.
- von Hundelshausen, P., & Weber, C. (2007). Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circulation Research*, 100(1), 27-40.
- Vostalova, J., Vidlar, A., Simanek, V., Galandakova, A., Kosina, P., Vacek, J., ... & Student, V. (2015). Are high proanthocyanidins key to cranberry efficacy in the prevention of recurrent urinary tract infection?. *Phytotherapy Research*, 29(10), 1559-1567.
- Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana-Rao, B.S. & Chattarji, S. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons, *Journal of Neurosciences*, 22, 6810–6818.
- Wachstein, M., Meisel, E., & Niedzwiedz, A. (1960). Histochemical demonstration of mitochondrial adenosine triphosphatase with the lead-adenosine triphosphate technique. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 8(5), 387-388.

- Wagner, H., Kraus, S., & Jurcic, K. (1999). Search for potent immunostimulating agents from plants and other natural sources. In *Immunomodulatory agents from plants* (pp. 1-39). Birkhäuser, Basel.
- Wang, J., Wang, H., Zhu, R., Liu, Q., Fei, J., & Wang, S. (2015). Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1 β transgenic mice subjected to the lipopolysaccharide-induced sepsis. *Biomaterials*, 53, 475-483.
- Wang, X., Zhang, C., Zheng, N., Ma, J., & Zhu, Y. F. (2016). Determination of arbutin in rat plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study after oral administration of the extract of *Vaccinium vitis-idaea*. *Journal of Chromatographic Science*, 54(9), 1508-1513.
- Warringa, R. A., Hoebe, R. C., Koper, J. W., Sykes, J. E., van Golde, L. M., & Lopes-Cardozo, M. (1987). Hydrocortisone stimulates the development of oligodendrocytes in primary glial cultures and affects glucose metabolism and lipid synthesis in these cultures. *Developmental Brain Research*, 34(1), 79-86.
- Wen, H., Dan, M., Yang, Y., Lyu, J., Shao, A., Cheng, X., ... & Xu, L. (2017). Acute toxicity and genotoxicity of silver nanoparticle in rats. *PLoS One*, 12(9), 1-16.
- Weng, G.R. & Goldon, M.H. (1992). Antioxidant activity of quinones extracted from tanshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1331-1336.
- Wennström, M., Hellsten, J., Ekstrand, J., Lindgren, H. & Tingström, A., (2006). Corticosterone-induced inhibition of gliogenesis in rat hippocampus is counteracted by electroconvulsive seizures. *Biological Psychiatry*, 59(2), 178-186.
- West, J. B. (2005). Robert Boyle's landmark book of 1660 with the first experiments on rarified air. *Journal of Applied Physiology*, 98(1), 31-39.
- Wheaton, B. (1985). Models for the stress-buffering functions of coping resources. *Journal of Health and Social Behavior*, 26(4), 352-364.

- Williamson, E. M., Okpako, D. T., & Evans, F. J. (1996). *Pharmacological methods in phytotherapy research: volume 1: Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material*. John Wiley & Sons Ltd.
- Wilson, T., Porcari, J.P. & Harbin, D. (1998). Cranberry extract inhibits low density lipoprotein oxidation. *Life Sciences*, 62, PL 381–PL 386,
- Wölflle, U., Seelinger, G., & Schempp, C. M. (2014). Topical application of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Medica*, 80(02/03), 109-120.
- Wu, M., Feng, K., Li, Q., Ma, H., Zhu, H., Xie, Y., ... & Yan, K. (2018). Glutaraldehyde-polymerized hemoglobin and tempol (PolyHb-tempol) has superoxide dismutase activity that can attenuate oxidative stress on endothelial cells induced by superoxide anion. *Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(1), 47-55.
- Xu, L., Yu, J., Zhai, D., Zhang, D., Shen, W., Bai, L., Cai, Z. & Yu, C. (2014). Role of JNK activation and mitochondrial Bax translocation in allicin-induced apoptosis in human ovarian cancer SKOV3. *Evid-Based in Complementary Alternative Medicine*, 2014, 1-6.
- XXX, Flora R.P. Română, vol. III, (1961). Ed. Acad. R.P.R., București, p. 549-589.
- y Cajal, Santiago Ramón. (2004). *Advice for a young investigator*. Mit Press, London, p. 10-13.
- Yalcin, FN, Kaya, D. (2006). Ethnobotany, pharmacology and phytochemistry of the genus *Lamium* (Lamiaceae). *Journal of Pharmaceutical Science*, 31, 43-52.
- Yang, H. & Chen, C. (2008). Cyclooxygenase-2 in synaptic signaling. *Current Pharmaceutical Design*, 14, 1443–1451.
- Yau, J.L.W., Noble, J. & Seckl, J.R. (2001). Acute restraint stress increases 5-HT7 receptor mRNA expression in the rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, 309(3), 141–144.

- Yeaman, M. R. (2014). Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nature Reviews Microbiology*, 12(6), 426-437.
- Yuting, C., Rongliang, Z., Zhongjian, J., & Yong, J. (1990). Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(1), 19-21.
- Zagayko, A., Briukhanova, T., Lytkin, D., Kravchenko, A., & Fylymonenko, V. (2019). Prospects for Using the Natural Antioxidant Compounds in the Obesity Treatment. In *Antioxidants*. IntechOpen. <https://www.intechopen.com/books/antioxidants>
- Zhang, D.D., (2006). Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway, *Drug Metabolism Reviews*, 38, 769-789.
- Zhang, H., Rothwangl, K., Mesecar, A.D., Sabahi, A., Rong, L.H.S. & Fong, H. (2009). Lamiridosins, hepatitis C virus entry inhibitors from *Lamium album*. *Journal of Natural Products*, 72, 2158-2162.
- Zhang, H., Wang, P., Xue, Y., Liu, L., Li, Z., & Liu, Y. (2018). Allicin ameliorates cognitive impairment in APP/PS1 mice via suppressing oxidative stress by blocking JNK signaling pathways. *Tissue and Cell*, 50, 89-95.
- Zhang, J., Huang, X. Y., Ye, M. L., Luo, C. X., Wu, H. Y., Hu, Y., ... & Zhu, D. Y. (2010). Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT1A receptor in modulating anxiety-related behaviors. *Journal of Neuroscience*, 30(7), 2433-2441.
- Zhou, T., Zu, G., Zhang, X., Wang, X., Li, S., Gong, X., ... & Zhao, J. (2016). Neuroprotective effects of ginsenoside Rg1 through the Wnt/ β -catenin signaling pathway in both in vivo and in vitro models of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 101, 480-489.
- Zhu Y.F., Li X.H., Yuan Z.P., Li C.Y., Tian R.B., Jia W. & Xiao Z.P. (2015). Allicin improves endoplasmic reticulum stressrelated cognitive deficits via PERK/Nrf2 antioxidative signaling pathway. *European Journal of Pharmacology*, 15, 1-28.

- Zirak, N., Shafiee, M., Soltani, G., Mirzaei, M., & Sahebkar, A. (2019). *Hypericum perforatum* in the treatment of psychiatric and neurodegenerative disorders: Current evidence and potential mechanisms of action. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8496-8508.
- Zschucke, E., Renneberg, B., Dimeo, F., Wüstenberg, T., & Ströhle, A. (2015). The stress-buffering effect of acute exercise: Evidence for HPA axis negative feedback. *Psychoneuroendocrinology*, 51, 414-425.



Dr. Vlad-Alexandru Toma (n. 11 iunie 1991, Bistrița) este biolog-biochimist, doctor în biologie *Summa cum Laude*, lector universitar la Departamentul de Biologie Moleculară și Biotehnologie al Universității Babeș-Bolyai și cercetător științific la Institutul de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca, în cadrul Departamentului de Biologie Experimentală și Biochimie. Autorul are o activitate științifică riguroasă, dovedită prin publicații în reviste internaționale cu scor de influență și factor de impact, conferințe susținute, alcătuind totodată și materiale universitare (cursuri, caiete de lucrări practice pentru uz intern). Autorul este coordonatorul Cercului Studențesc de Neuroștiințe al Facultății de Biologie și Geologie și totodată, Președinte al Filialei Cluj-Napoca a Societății Române de Biologie Celulară. În ultimul deceniu, asociat cu dezvoltarea sa academică, a abordat și continuă cercetarea mecanismelor senzorial pentru hipoxie în sistemul nervos, tumori și țesuturi adiacente implicate, cu un interes deosebit asupra biochimiei globinelor. În plan secundar, abordează cercetarea comparativă în seria animală a răspunsului la hipoxie la nivelul sistemului nervos central. Prin cercetările și activitatea sa didactică, autorul tratează subiectele și problemele biologiei și patologiei celulare într-o manieră translațională, absolut necesară generării cunoașterii în secolul vitezei și al tehnologizării. Didactic, susține cursuri și lucrări practice de Enzimologie, Hematologie Medicală, Hematologie transfuzională, Toxicologie, Biochimie clinică, Biochimia proteinelor cu elemente de Proteomică, Biochimie structurală respectiv Biochimia metabolismului.

